

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-506731

(43) 公表日 平成8年(1996)7月23日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	8828-4B	
1/21		8827-4B	
9/30		9162-4B	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		(C 1 2 N 15/00	Z N A A
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-518568
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)2月18日
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)8月21日
 (86) 国際出願番号 P C T / D K 9 4 / 0 0 0 7 1
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 1 9 4 5 4
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)9月1日
 (31) 優先権主張番号 0 1 9 6 / 9 3
 (32) 優先日 1993年2月19日
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)
 (31) 優先権主張番号 1 0 2 7 / 9 3
 (32) 優先日 1993年9月13日
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ
 ブ
 デンマーク国, デーヨー—2880 バグスバ
 エルト, ノボ アレ (番地なし)
 (72) 発明者 ヨルゲンセン, ステーン トロエルス
 デンマーク国, デーヨー—3450 アレル
 ト, プルンスパイ 5
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デンブ分解酵素

(57) 【要約】

デンプン分解活性を示す酵素をエンコードしており、そして a) 部分的アミノ酸配列 (I) の中の少なくとも 1 をエンコードしている DNA 配列を含んで成り、そして / 又は b) 配列番号 1 - 6 中に示す DNA 配列の中のいずれかに基づいて、その DNA 配列の中のいずれかによりエンコードされているアミノ酸配列又は配列番号 9 中に示すアミノ酸配列に基づいて、又は上記 a) 中に列記した部分的アミノ酸配列 (a) - (R) の中のいずれかに基づいて、調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズする DNA 配列を含んで成り、そして / 又は c) 配列番号 9 中に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% の相同性をもつポリペプチドをエンコードしている、DNA 構築物、並びにその DNA 構築物によりエンコードされたデンプン分解酵素。本デンプン分解酵素は、好ましくは、始原細菌起源をもち、例えば、ピロコッカス種 (*Pyrococcus* sp.) の株、例えば、ピロコッカス・フリオサス (*P. furiosus*) から得られることができ、そして例えば、デンプン液化のために使用されることができる。

【特許請求の範囲】

1. ピロコッカス α -アミラーゼを又は α -アミラーゼ活性をもち、そして／又はピロコッカス α -アミラーゼと免疫学的に交差反応性であるその変異体をエンコードしているDNA配列を含んで成るDNA構築物であって、そのDNA配列が、

i) 配列番号2, 3, 4, 5及び／又は6中に示す部分的DNA配列又は配列番号2, 3, 4, 5及び／又は6中に示すDNA配列に基づいて調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる上記部分的配列のアナログを含んで成り、又は

ii) 配列番号2, 3, 4, 5及び／又は6中に示すDNA配列に基づき調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズする5kbのゲノムDNA配列内に位置するゲノム・ピロコッカスDNA配列に一致し、又は

iii) 配列番号1中に示すDNA配列又は配列番号1中に示すDNA配列に基づき調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる上記配列のアナログを含んで成る、

ようなDNA構築物。

2. ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列が、配列番号5及び6中に示すDNA配列に基づいてそれぞれ調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる添付の配列番号5及び6又はそれらのアナログ中に同定された部分的DNA配列の間に位置し、そして場合によりそれを含んで成るゲノム・ピロコッカスDNA断片に一致するような、請求項1に記載のDNA構築物。

3. 請求項1中に定義したような特性i) - iii)のいずれかをもつDNA配列とハイブリダイズするピロコッカスDNA配列を含んで成

るDNA構築物。

4. デンブun分解活性を示す酵素をエンコードしているDNA構築物であって、そのDNA構築物が、

a) 以下の部分的アミノ酸配列：

(a) AKYLELEEGG (配列番号10) ; (b) VIMQAFYWDV (配列番号11) ;

(c) PGGGIWWDHI (配列番号12) ; (d) RSKIPEWYEA (配列番号13) ;
 (e) GISAIWLPPP (配列番号14) ; (f) SKGMSGGYSM (配列番号15) ;
 (g) GYDPYDYFDL (配列番号16) ; (h) GEYYQKGTVE (配列番号17) ;
 (i) TRFGSKEELV (配列番号18) ; (j) RLIQTAHAYG (配列番号19) ;
 (k) IKVIADVVIN (配列番号20) ; (l) HRAGGDLEWN (配列番号21) ;
 (m) PFVGDYTWTD (配列番号22) ; (n) FSKVASGKYT (配列番号23) ;
 (o) ANYLDFHPNE (配列番号24) ; (p) LHCCDEGTFG (配列番号25) ;
 (q) GFDPDICHKE (配列番号26) ; (r) WDQYWLWKS (配列番号27) ;
 (s) ESYAAYLRIS (配列番号28) ; (t) GFDGWRFDYV (配列番号29) ;
 (u) KGYGAWVVRD (配列番号30) ; (v) WLNWWGGWAV (配列番号31) ;
 (x) GEYWDTNVDA (配列番号32) ; (y) LLSWAYESGA (配列番号33) ;
 (z) KVFDFPLYK (配列番号34) ; (A) MDEAFDNNI (配列番号35) ;
 (B) PALVYALQNG (配列番号36) ; (C) QTVVSRDPFK (配列番号37) ;
 (D) AVTFVANHDT (配列番号38) ; (E) DIIWNKYPAY (配列番号39) ;
 (F) AFILTYEGQP (配列番号40) ; (G) VIFYRDFEEW (配列番号41) ;
 (H) LNKDKLINLI (配列番号42) ; (I) WIHDHLAGGS (配列番号43) ;
 (J) TTIVYYDNDE (配列番号44) ; (K) LIFVRNGDSR (配列番号45) ;
 (L) RPGLITYINL (配列番号46) ; (M) SPNWWGRWVY (配列番号47) ;
 (N) VPKFAGACIH (配列番号48) ; (O) EYTGNLGGWV (配列番号49) ;
 (P) DKRVDSSGWV (配列番号50) ; (Q) YLEAPPHDPA (配列番号51) ;
 (R) NGYYGYSVWSYCGVG (配列番号52) 、

の中の少なくとも1をエンコードしているDNA配列を含んで成り、

そして／又は

b) 配列番号1-6中に示すDNA配列の中のいずれかに基づいて、そのDNA配列の中のいずれかによりエンコードされているアミノ酸配列又は配列番号9中に示すアミノ酸配列に基づいて、又は上記a)中に列記した部分的アミノ酸配列(a)-(R)の中のいずれかに基づいて、調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズするDNA配列を含んで成り、そして／又は

c) 配列番号9中に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつポリペプチドをエンコードしている、
ようなDNA構築物。

5. デンブン分解活性を示す酵素が、 α -アミラーゼ、特に、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体である、請求項4に記載のDNA構築物。

6. DNA配列が、好熱性始原細菌から得られることができる、請求項1-5の中のいずれかに記載のDNA構築物。

7. DNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ (Pyrococcus woesei) の株又はピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) の株から得られることができる、請求項6に記載のDNA構築物。

8. DNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ株DSM 3773又はピロコッカス・フリオサス株DSM 3638から、あるいは α -アミラーゼ生産能力をもつこれらの株のいずれかの突然変異体又は誘導体から、得られることができる、請求項7に記載のDNA構築物。

9. 請求項1-8の中のいずれかに記載のDNA構築物を宿すベクター。

10. プラスミド又はバクテリオファージである、請求項9に記載のベクター。

11. デンブン分解酵素、例えばピロコッカス α -アミラーゼ又は

その変異体の発現を許容するDNA配列をさらに含んで成る発現ベクターである、請求項9又は10に記載のベクター。

12. 請求項1-8の中のいずれかに記載のDNA構築物又は請求項9-10の中のいずれかに記載のベクターを宿す宿主細胞。

13. 微生物である、請求項12に記載の宿主細胞。

14. バクテリア又は菌である、請求項13に記載の宿主細胞。

15. グラム陽性菌、例えば、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・レントス (Bacillus lentus)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス・アルカロ

フィルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefacience)、バチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・ラウタス (Bacillus lautus)、バチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) 又はストレプトミセス・リビダンス (Streptomyces lividans) 又はストレプトミセス・ムリナス (Streptomyces murinus)、あるいはグラム陰性菌、例えば、E. コリ (E. coli) である、請求項14に記載の宿主細胞。

16. バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis) の細胞とは異なり、そしてピロコッカス (Pyrococcus) α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列を含んで成るDNA構築物を宿す、バチルス細胞。

17. ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ (Pyrococcus woesei) の株又はピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus)

の株から得られることができる、請求項16に記載のバチルス (Bacillus) 細胞。

18. DNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ株DSM 3773又はピロコッカス・フリオサス株DSM 3638又は α -アミラーゼ活性を作り出すことができるこれらの株のいずれかの突然変異体又は誘導体から、得られることができる、請求項17に記載のバチルス細胞。

19. バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・レントス (Bacillus lentus)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス・アルカロフィルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefacience)、バチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・ラウタス (Bacillus lautus) 又はバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) から得られる、請求項16に記載のバチルス細胞。

20. デンブン分解酵素、特にピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の製造方法であって、そのデンブン分解酵素の発現を許容する条件下、好適な培養基

中、請求項12-19の中のいずれかに記載の細胞を培養し、そしてそのカルチャーから得られたデンプン分解酵素を回収することを含んで成る方法。

21. 請求項20に記載の方法により製造された、デンプン分解酵素、特に、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体。

22. 配列番号9中に示すアミノ酸配列を含んで成るピロコッカス α -アミラーゼ、あるいは α -アミラーゼ活性をもち、そして／又は配列番号9中に示すアミノ酸配列を含んで成る α -アミラーゼと

免疫学的に交差反応性であり、そして／又は配列番号9中に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつその変異体。

23. a) 以下の部分的配列：

- (a) AKYLELEEGG (配列番号10) ; (b) VIMQAFYWDV (配列番号11) ;
- (c) PGGGIWWDHI (配列番号12) ; (d) RSKIPEWYEA (配列番号13) ;
- (e) GISAIWLPPP (配列番号14) ; (f) SKGMSGGYSM (配列番号15) ;
- (g) GYDPYDYFDL (配列番号16) ; (h) GEYYQKGTVE (配列番号17) ;
- (i) TRFGSKEELV (配列番号18) ; (j) RLIQTAHAYG (配列番号19) ;
- (k) IKVIADV VIN (配列番号20) ; (l) HRAGGDLEWN (配列番号21) ;
- (m) PFVGDYTWTD (配列番号22) ; (n) FSKVASGKYT (配列番号23) ;
- (o) ANYLDFHPNE (配列番号24) ; (p) LHCCDEGTFG (配列番号25) ;
- (q) GFDPICHHKE (配列番号26) ; (r) WDQYWLWKS N (配列番号27) ;
- (s) ESYAAYLR SI (配列番号28) ; (t) GFDGWRFDYV (配列番号29) ;
- (u) KGYGAWVVRD (配列番号30) ; (v) WLNWWGGWAV (配列番号31) ;
- (x) GEYWD TNVDA (配列番号32) ; (y) LLSWAYESGA (配列番号33) ;
- (z) KVFDFPLY YK (配列番号34) ; (A) MDEAFDNN NI (配列番号35) ;
- (B) PALVYALQ NG (配列番号36) ; (C) QTVVSRDP FK (配列番号37) ;
- (D) AVTFVANH DT (配列番号38) ; (E) DIIWNKY PAY (配列番号39) ;
- (F) AFILTYEG QP (配列番号40) ; (G) VIFYRDFEE W (配列番号41) ;
- (H) LNKDKLIN LI (配列番号42) ; (I) WIHDHLAG GS (配列番号43) ;
- (J) TTIVYYDN DE (配列番号44) ; (K) LIFVRNGDS R (配列番号45) ;

- (L) RPGLITYINL (配列番号46) ; (M) SPNWWGRWVY (配列番号47) ;
(N) VPKFAGACIH (配列番号48) ; (O) EYTGNLGGWV (配列番号49) ;
(P) DKRVDSSGWV (配列番号50) ; (Q) YLEAPPHDPA (配列番号51) ;
(R) NGYYGYSVWSYCGVG (配列番号52) 、

の中のもの少なくとも1を含んで成り、そして／又は

b) 配列番号1-6中に示すDNA配列の中のいずれかに基づいて

、そのDNA配列の中のいずれかによりエンコードされているアミノ酸配列又は配列番号9中に示すアミノ酸配列に基づいて、又は上記a)中に列記した部分的アミノ酸配列(a)-(R)の中のいずれかに基づいて、調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズするDNA配列によりエンコードされており、そして／又は

c) 配列番号9中に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつ、デンプン分解酵素。

24. 酵素が、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体である、請求項23に記載のデンプン分解酵素。

25. 請求項21-24の中のいずれかに記載のピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の存在中、水性デンプン・スラリーを酵素的液化に供することを含んで成るデンプン液化方法。

26. 方法が、デンプン・スラリーへのカルシウム塩の添加を本質的に伴わずに行われる、請求項25に記載のデンプン液化方法。

27. 方法が、120分までにわたる100~140℃のレンジ内の温度におけるジェットクッキング、場合によりその後の、約30~120分にわたる90~100℃のレンジ内において保持されるであろう上記温度の減少により行われ、その後、このようにして液化されたデンプンが老化(retrogradation)に対して安定であり、そのpHが、その方法の全体を通じて約4.0~5.5において保持されるような、請求項25又は26に記載のデンプン液化方法。

28. 液化された酵素が、中間のpH調整を実質的に伴わずに、グルコアミラーゼの存在中、酵素的糖化に供される、請求項25-27の中のいずれかに記載のデンプ

ン液化方法。

29. 糖化と同時の又はその後の酵母によるエタノール発酵をさらに含んで成る、請求項28に記載のデンプン液化方法。

30. デンプン液化方法であって、

a) ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の発現を許容する条件下、好適な培養基中、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体をエンコードしているDNA配列を担持している請求項12-19の中のいずれかに記載の好適な宿主細胞を培養し、そしてそのカルチャーから得られた α -アミラーゼ又はその変異体を回収し、そして

b) 段階 a) において回収された α -アミラーゼ又はその変異体の存在中、水性デンプン・スラリーを酵素的液化（融解）に供する、
を含んで成る方法。

31. デンプンの液化及び／又は糖化、デンプンの枝切断、シロップの生産、シクロデキストリンの生産、又はオリゴ糖の生産のための、請求項21-24の中のいずれかにおいて定められたデンプン分解酵素の使用。

【発明の詳細な説明】

デンプン分解酵素

発明の分野

本発明は、デンプン分解酵素 (amylolytic enzyme)、特にピロコッカス (Pyrococcus) α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列を含んで成るDNA構築物、並びにそのDNA構築物を宿しているベクター及び細胞に関する。さらに本発明は、組換えDNA技術による上記デンプン分解酵素の製造方法に関する。

発明の背景

ここ10年間、好熱性微生物、例えば始原細菌により生産される酵素は、多くの工業的用途のために望ましい主にそれらの高い熱安定性のために益々重要な対象となってきた。

このような超好熱性酵素の例は、好熱性始原細菌ピロコッカス (Pyrococcus) の株にあり生産されたものである。例えば、W090/11352は、ピロコッカス株を培養し、そしてそれからアルファアミラーゼ調製物を単離することを含む慣用の発酵手順によりピロコッカス・ウォエセイ (P. woesei) 及びピロコッカス・フリオサス (P. furiosus) の株から得られた新規のピロコッカスのアルファアミラーゼについて開示している。さらに、Koch et al. (1990) 及びBrown et al. (1990) は、部分的に精製されたピロコッカス・フリオサス (P. furiosus) の α -アミラーゼについて記載している。W092/02614は、ピロコッカス種から得られた新規の熱安定性ブルラナーゼについて開示している。

それぞれ、W090/11352及びW092/02614中に開示されたピロコ

ッカス α -アミラーゼ及びブルラナーゼは、他の公知の α -アミラーゼ及びブルラナーゼに比べて非常に高い熱安定性を有することが発明され、そして α -アミラーゼ又はブルラナーゼ活性を含む高温プロセスにおいて有用であると述べられている。

その純度を改良する観点並びにその酵素を発現することができる親株を培養することにより可能であるものよりも低コストでより多量の精製酵素を提供する観

点の両方において、上記デンプン分解酵素、及び一般的なデンプン分解酵素の生産を容易にすることが望ましいであろう。

発明の簡単な開示

本発明者は、今般、始原細菌種の株ピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) から α -アミラーゼをエンコードしているDNAをクローニングし、そしてそのDNAを宿している宿主細胞からの α -アミラーゼの発現を得ることに成功した。本発明は、この発明に基づく。

より特に、第一の態様においては、本発明は、ピロコッカス α -アミラーゼを又は α -アミラーゼ活性をもち、そして／又はピロコッカス α -アミラーゼと免疫学的に交差反応性であるその変異体をエンコードしているDNA配列を含んで成るDNA構築物に関し、そのDNA配列は、

- i) 配列番号 2, 3, 4, 5 及び／又は 6 中に示す部分的DNA配列又は配列番号 2, 3, 4, 5 及び／又は 6 中に示すDNA配列に基づいて調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる上記部分的配列のアナログを含んで成り、
- ii) 配列番号 2, 3, 4, 5 及び／又は 6 中に示すDNA配列に基づき調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズす

る 5 kb のゲノムDNA配列内に位置するゲノム・ピロコッカスDNA配列に一致し、そして／又は

- iii) 配列番号 1 中に示すDNA配列又は配列番号 1 中に示すDNA配列に基づき調製されることが出来るオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる上記配列のアナログを含んで成る。

図 1 中に示すDNA配列は、 α -アミラーゼをエンコードしているオープン・リーディング・フレームを含んで成る。その部分的DNA配列 2-6 は、以下にさらに説明するように、このオープン・リーディング・フレームの部分から成るか又はそれに隣接する。

本発明のDNA構築物の特性 ii) をもつDNA配列について使用するとき用語 “一致する (corresponds)” は、そのDNA配列が、以下にさらに説明するようにゲノム

、cDNA及び／又は合成起源を含むいずれかの起源を有することができることを意図される。

さらなる態様においては、本発明は、デンプン分解活性を示す酵素をエンコードしているDNA構築物であって、そのDNA構築物が、

a) 以下の部分的アミノ酸配列の中の少なくとも1をエンコードしているDNA配列を含んで成り

- (a) AKYLELEEGG (配列番号10) ; (b) VIMQAFYWDV (配列番号11) ;
(c) PGGGIWWDHI (配列番号12) ; (d) RSKIPEWYEA (配列番号13) ;
(e) GISAIWLPPP (配列番号14) ; (f) SKGMSGGYSM (配列番号15) ;
(g) GYDPYDYFDL (配列番号16) ; (h) GEYYQKGTVE (配列番号17) ;
(i) TRFGSKEELV (配列番号18) ; (j) RLIQTAHAYG (配列番号19) ;
(k) IKVIADVVIN (配列番号20) ; (l) HRAGGDLEWN (配列番号21) ;
(m) PFVGDYTWTD (配列番号22) ; (n) FSKVASGKYT (配列番号23) ;
(o) ANYLDFHPNE (配列番号24) ; (p) LHCCDEGTFG (配列番号25) ;
(q) GFDPDICHKE (配列番号26) ; (r) WDQYWLWKS (配列番号27) ;

(s) ESYAAYLRIS (配列番号28) ; (t) GFDGWRFDYV (配列番号29) ;
(u) KGYGAWVVRD (配列番号30) ; (v) WLNWWGGWAV (配列番号31) ;
(x) GEYWDTNVDA (配列番号32) ; (y) LLSWAYESGA (配列番号33) ;
(z) KVFDFPLYK (配列番号34) ; (A) MDEAFDNNNI (配列番号35) ;
(B) PALVYALQNG (配列番号36) ; (C) QTVVSRDPFK (配列番号37) ;
(D) AVTFVANHDT (配列番号38) ; (E) DIWNKYPAY (配列番号39) ;
(F) AFILTYEGQP (配列番号40) ; (G) VIFYRDFEEW (配列番号41) ;
(H) LNKDKLINLI (配列番号42) ; (I) WIHDHLAGGS (配列番号43) ;
(J) TTIVYYDNDE (配列番号44) ; (K) LIFVRNGDSR (配列番号45) ;
(L) RPGLITYINL (配列番号46) ; (M) SPNWWGRWVY (配列番号47) ;
(N) VPKFAGACIH (配列番号48) ; (O) EYTGNLGGWV (配列番号49) ;
(P) DKRVDSSGWV (配列番号50) ; (Q) YLEAPPHDPA (配列番号51) ;
(R) NGYYGYSVWSYCGVG (配列番号52) 、

そして／又は、

b) 配列番号 1 - 6 中に示すDNA配列の中のいずれかに基づいて、そのDNA配列の中のいずれかによりエンコードされているアミノ酸配列又は配列番号 9 中に示すアミノ酸配列に基づいて、又は上記 a) 中に列記した部分的アミノ酸配列 (a) - (R) の中のいずれかに基づいて、調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズするDNA配列を含んで成り、そして／又は

c) 配列番号 9 中に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつポリペプチドをエンコードする、

ようなDNA構築物に関する。

さらなる態様においては、本発明は、上記DNA構築物によりエンコードされたデンプン分解酵素に関する。

本文脈中、用語“デンプン分解活性 (amylolytic activity)”は、問題の酵素がデンプン分解能力をもつことを示すことを意図さ

れる。デンプン分解活性をもつ酵素、すなわちデンプン分解酵素の特定の例は、 α -アミラーゼ、プルラナーゼ (pullulanases)、neo-プルラナーゼ (neo-pullulanases)、iso-アミラーゼ (iso-amylases)、ベータ-アミラーゼ (beta-amylases)、CTGases、マルトゲナーゼ (maltogenases) 並びに G - 4 及び G - 6 アミラーゼを含む。

一般的に、先に述べた共通の機能的特徴にも抱らず、デンプン分解酵素は、共通の構造的特徴をもつことが知られている。デンプン分解酵素の2次構造は、高い相同性の領域を含んで成る、いいかえれば、アミノ酸領域が異なるタイプのデンプン分解酵素間で高く保存されていることが発明されている。例えば、Padkov yrov (1992) ; Zhou (1989) 及び Srensson (1988) を参照のこと。

配列番号 9 中に示すアミノ酸配列をもつピロコッカス α -アミラーゼの一部を構成し、そしてそれ自体新規であると発見されている先に示した部分的アミノ酸配列は、それ故、本明細書に開示するピロコッカス α -アミラーゼについてだけでなく、他のデンプン分解酵素についても同様に特徴的であることが見い出されることができる。これらの部分的配列は、新規のデンプン分解酵素の同定及び単

離における重要な道具を構成するよう企図される。

さらなる態様においては、本発明は、本発明のDNA構築物を宿すベクター、及びそのDNA構築物又は本発明のベクターのいずれかを宿す細胞に関する。

本発明を導く研究の経過において、要求されるそのDNA配列のいずれの修飾を伴わずにピロコッカスDNA配列により形質転換されたバチルス (*Bacillus*) 株からの α -アミラーゼ発現を得ることが可能であることが、恐くべきことに発見された。例えば、翻訳されるべき遺伝子のリボソーム結合部位の修飾又は置換を含むこのような

修飾は、正常には、バチルス内での効率的な翻訳、そしてそれによる非-グラム陽性DNA配列からの発現の獲得に不可欠であると考えられる。以下の実施例6中に与える説明をも参照のこと。本発明者らが知っている限り、バチルスにおけるピロコッカス α -アミラーゼ遺伝子の発現についての先行する開示は全く存在しない。本出願の優先日の直後に公開されたW093/10248は、ピロコッカス α -アミラーゼを含む特定のタンパク質の組換え生産のための宿主細胞としてのバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) の使用について開示している。

先に記載した発見に基づいて、ピロコッカス α -アミラーゼ遺伝子の直接的発現が一般的に、バチルスの株において獲得されることができると企図され、そして、従って、特定の態様において、本発明は、バチルス・リケニホルミスの細胞とは異なり、そして、ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列を含んで成るDNA構築物であって、場合により、発現ベクター上に存在するものを宿す、組換え体バチルス細胞に関する。

さらなる態様においては、本発明は、組換え体デンプン分解酵素、特に組換え体ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の生産方法であって、そのデンプン分解酵素の発現を許容する条件下、好適な培養基中先に記載したような細胞を培養し、そしてそのカルチャーから得られたデンプン分解酵素を回収する、ことを含んで成る方法に関する。

本発明に係る方法の使用により、デンプン分解酵素、例えば、本発明のDNA構築物によりエンコードされているピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体は

、高い量において、かつ高い純度において生産され、それにより、例えば、いずれかの他の酵素活性を本質的に含まない単一成分形態における問題のデンプン分解酵素の生産

を最適化することができる。

本発明は、配列番号9中に示すアミノ酸を含んで成る組換えピロコッカス α -アミラーゼ又は配列番号9中に示すアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドと免疫学的に交差反応性であり、そして/又は配列番号9中に示すアミノ酸配列に少なくとも70%の相同性をもつその変異体にも関する。

本文脈中、用語“変異体”は、1以上のアミノ酸残基により配列番号9のものとは異なったアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドを含むことを意図される。変異体は、 α -アミラーゼのN-末端とC-末端のいずれか又は両方への1以上のアミノ酸残基の付加、アミノ酸配列内の1以上の異なる部位における1以上のアミノ酸残基の置換、 α -アミラーゼのいずれかの端又は両端における又はアミノ酸配列内の1以上の部位における1以上のアミノ酸残基の欠失、あるいはアミノ酸配列内の1以上の部位における1以上のアミノ酸残基の挿入をもたらす α -アミラーゼをエンコードしているDNA配列、好ましくは本発明のDNA構築物内に存在するDNA配列を好適に修飾することにより、調製されることができる。DNA配列の修飾は、よく知られた手順に従って、部位指定突然変異誘発により又はランダム突然変異誘発により、あるいはこれらの技術の組み合わせにより行われることができる。修飾の後、修飾されたDNAの遺伝子産物が発現され、そして α -アミラーゼ活性、精製ピロコッカス α -アミラーゼとの免疫学的交差反応性、又は配列番号9中に示すアミノ酸配列との相同性についてテストされる。用語“変異体 (variant)”は、 α -アミラーゼ活性をもち、そして/又はピロコッカス α -アミラーゼに対して作られた抗体と反応性であるピロコッカス α -アミラーゼのサブ配列を含むことを意図されると理解されよう。

本発明のDNA構築物によりエンコードされたピロコッカス α -ア

ミラーゼは、高温において行われるデンプン融解における使用に特に好適である

。従って、さらなる態様においては、本発明は、ピロコッカス α -アミラーゼ又は本発明の変異体の存在中、水性デンプン・スラリーを酵素融解に供することを含んで成るデンプン融解方法 (starch liquefaction process) に関する。

最後の態様においては、本発明は、デンプン融解及び／又は糖化 (saccharification)、デンプンの枝切断、さまざまなシロップ、例えばマルトース・シロップの生産、サイクロデキストリンの生産、及びオリゴ糖の生産、を含むデンプン修飾のための本発明に係るデンプン分解酵素の使用に関する。

発明の詳細な説明

配列番号 2, 3, 4, 5 及び 6 から明らかな部分的DNA配列は、 α -アミラーゼ活性をエンコードしている約 5 kbのDNA配列を宿す始原細菌種ピロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) の株から調製されたゲノム・クローンから得られる。以下の実施例を参照のこと。異なるクローン内で同定された部分的DNA配列番号 3 及び 6 は、その配列番号 6 が配列番号 3 よりも長いことを除けば、同一である。この配列の両方が、7 位 (GTG) に始まる α -アミラーゼのコーディング配列の N-末端部分を含んで成る。配列番号 2 及び 4 は、その同一のXba I 部位 (TCTAGA) 内に始まる配列番号 1 中に示すコーディング配列の内部部分を構成する。配列番号 2 は、上流方向に読まれ、一方、配列番号 4 は、下流方向に読まれる。配列番号 5 は、そのコーディング配列の 3' 末端の約 3.3 kb 下流に位置し、そして上流に読まれる。

部分的DNA配列 (配列番号 2, 3, 4, 5 及び 6) は、別々にか又は 2 以上の組み合わせのいずれかにおいて、ピロコッカス α -ア

ミラーゼをエンコードしているDNA配列の単離において使用されることができる。本明細書中の実施例を参照のこと。従って、これらの配列は、配列番号 1 内で同定されたDNA配列の単離において、そしてそれ故に組換え体ピロコッカス α -アミラーゼの調製において重要な道具を構成することが見いだされた。

ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしている本発明のDNA構築物中、配列番号 1 中に示すDNA配列の又は配列番号 2, 3, 4, 5 及び 6 中に示す部分的DNA配列の中のいずれかのアナログは、例えば、これらのDNA配列、

よく知られた手順、例えば、部位指定突然変異誘発により調製されることができ、これらの配列の遺伝子操作された修飾物、又はピロコッカス種の株から単離されたピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列の中のいずれかのサブ配列であることができる。いずれの事件においても、類似のDNA配列は、配列番号1中に示すDNA配列又はサブ配列又はその配列全体を構成する配列番号2, 3, 4, 5又は6の部分的DNA配列の中のいずれかに基づいて調製されることができ、オリゴヌクレオチド・プローブにハイブリダイズしなければならない。あるいは、好適なオリゴヌクレオチド・プローブは、例えば、配列番号8又は9中に示すアミノ酸配列のいずれかの部分に基づき、配列番号1, 2, 3, 4, 5、及び6の1以上のDNA配列を宿す本発明のDNA構築物によりエンコードされたアミノ酸配列に基づいて調製されることができ、

成熟 α -アミラーゼ酵素の配列番号9中に示すアミノ酸配列に基づき、配列番号1中に示すDNA配列がその α -アミラーゼのエンコーディング能力に影響を及ぼさずに変化することができ、そのような程度で分析を行った。この分析の結果として、配列番号9中に示すアミノ酸配列をもつポリペプチドをエンコードする能力を保持してい

る最も“異なった”DNA配列が配列番号1中に示すDNA配列と約62.6%の相同性を示すものであることが判明した。

従って、配列番号1中に示すDNA配列のアナログは、上記DNA配列と少なくとも62.5%の相同性をもつもの、より好ましくは、配列番号1中に示すDNA配列と少なくとも70%の相同性、例えば少なくとも80%の相同性、さらにより好ましくは少なくとも90%の相同性をもつものである。本文脈中、相同性は、第1配列の第2配列からの逸脱（ずれ）を示すその2配列間の同一性の程度として決定される。特定の態様においては、配列番号1中に示すDNA配列のアナログは、合成遺伝子である。

DNA配列のその関連オリゴヌクレオチド・プローブ（単数又は複数）とのハイブリダイゼーションは、そのDNA配列がハイブリダイズすることを許容するいずれかの好適な条件の下で行われることができる。例えば、このような条件は、例

えば、 $5 \times \text{SSC}$ 中での前浸漬、及び20%ホルムアミド、 $5 \times \text{Denhardt's}$ 溶液、 50mM リン酸ナトリウム、 $\text{pH } 6.8$ 、及び $50 \mu\text{g}$ の変性音波処理ウシ胸腺DNAの溶液中、1時間 $\sim 40^\circ\text{C}$ における前ハイブリダイジング、その後の、 $\sim 40^\circ\text{C}$ において18時間 $100 \mu\text{M}$ ATPを補った同一溶液中でのハイブリダイゼーション、又は例えばSambr ook et al., 1989により記載された他の方法を含む特定の条件下でのハイブリダイゼーションである。

本発明のDNA構築物によりエンコードされているピロコッカス α -アミラーゼの変異体の免疫交差反応性は、組換え体又は天然起源を有し、そして好ましくは本発明のDNA構築物によりエンコードされることができるピロコッカス α -アミラーゼの少なくとも1のエピトープに対して生じ又はそれと反応性の抗体を使用して検定されることができる。モノクロナール又はポリクロナールのいずれかであることができる抗体が、例えばHudson et al., 1989により記載

されたように本分野において公知の方法により作られることができる。この免疫学的交差反応性は、本分野において公知の検定法を使用して測定されることができ、これらの例は、ウェスタン・ブロッティング又は、例えば、Hudson et al., 1989中に記載されたような免疫拡散検定である。

配列番号5及び6中に同定される部分的DNA配列は、以下の実施例中に記載するような*P. furiosus*株DSM 3638から単離されたゲノムDNA配列の α -アミラーゼ・エンコーディング部分に隣接し、その α -アミラーゼ・エンコーディングDNAの開始コドンが部分的配列番号6の一部を構成していることが見つかった。先に定義されたような類似のDNA配列は、同様に、他のピロコッカスの α -アミラーゼ・エンコーディング配列又は他のデンプン分解酵素をエンコードしている配列に隣接して在ることができる。従って、本発明のDNA構築物中、デンプン分解酵素、及び特にピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列は、好ましくは、配列番号5と6中に示すDNA配列に基づき、それぞれ調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる添付の配列番号5と6又はそれらのアナログ内で同定された部分的DNA配列の間に位置し、そして場合によりそれを含んで成るゲノムのピロコッカスDNA断片に一致

する。

また、先の特性 i) - iii) の中のいずれかをもつDNA配列とハイブリダイズするDNA配列を宿すDNA構築物も本発明の内にあると考えられる。このようなDNA構築物は、配列番号 1 - 6 中に示す配列又はそのアナログの中の 1 以上を含んで成ることができるが、含む必要はない。

先に述べたように、配列番号 1 - 6 中に示すDNA配列は、ピロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) 株、Deutsche Samm

lung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHから入手可能なピロコッカス・フリオサス (*P. furiosus*) 株DSM 3638から調製されたゲノム・クローンから決定された。デンプン分解酵素の群内に正常に在る高程度の相同性のために配列番号 1 - 6 中に示すDNA配列に相同であり、そして本明細書中に開示するピロコッカス・アミラーゼ以外のデンプン分解酵素をエンコードしているDNA配列が、好熱性生物、例えば、始原細菌を含む他の生物及び極限条件下で生存する他タイプの生物内で同定されることができることが企図される。

従って、本発明に係るDNA構築物のDNA配列は、始原細菌、特に好熱始原細菌、例えばピロコッカス (*Pyrococcus*) 属の株から、特にピロコッカス・ウォエセイ (*P. woesei*) 又はピロコッカス・フリオサス (*P. furiosus*) の株から得られることができる。このような株は、始原細菌を宿すと期待される場所、例えば、温泉、等から確立された手順により単離されることができ、又は公に入手可能なカルチャー・コレクションから獲得されることができ。

類似のDNA配列の例は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHから入手可能なピロコッカス・ウォエセイ (*P. woesei*) 株DSM 3773から得ることができるDNA配列である。この株から単離された染色体DNAは、ピロコッカス・フリオサスからの α -アミラーゼ遺伝子を含む4.5kbのゲノム断片とハイブリダイズすることが発見され(実施例3及び4を参照のこと)、そしてそれ故、先の特性 i) - iii) をもつDNA配列とハイブリダイズするDNA配列の例を構成する。さらに、本発明のDNA構築物の類似のDNA配列が、それらの α -アミラーゼ生産能力を保持している寄託されたピロコッカス・フリオサス株DSM 3638と

ピロコッカス・ウォエセイ株DSM 3773の突然変異体及び誘導体から獲得されることとがで

きる。

デンプン分解酵素をエンコードしているDNA配列を含んで成る本発明のDNA構築物においては、配列番号9中に示すアミノ酸配列との相同性、すなわち特性c)は、第一配列の第二配列からのずれを示す、そのDNA配列によりエンコードされたポリペプチドと、配列9中に示すアミノ酸配列との間の同一性の程度を示すことを意図される。特に、対応のアミノ酸配列の比較が約70%より大きい、例えば約75%、80%、85%、90%又はさらに95%より大きな同一性を現わす場合、配列番号9中に示すアミノ酸配列に相同性をもつと考えられる。配列の比較は、公知のアルゴリズム、例えば、Lipman and Pearsonにより記載されたもの(1985)を紹介して行われることができる。

デンプン分解酵素をエンコードしている本発明のDNA構築物の好ましい例は、先に記載したようなピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA構築物である。

本発明のDNA構築物のDNA配列は、よく知られた方法により調製されることができる。従って、DNA配列は、例えば、その配列を宿することが予想される生物、例えば、先に記載されたような細胞からcDNA又はゲノム・ライブラリーを樹立し、そして慣用の手順により陽性クローンについてスクリーニングすることにより、単離されることができる。このような手順の例は、標準的な技術に従う先に記載したようなオリゴヌクレオチド・プローブへのハイブリダイゼーション(Sambrook et al., 1989参照)、及び／又はデンプン分解性、例えば、 α -アミラーゼ活性を発現するクローンについての選択、及び／又はデンプン分解酵素、例えば、本発明のDNA構築物によりエンコードされたピロコッカス α -アミラーゼに対して生じた抗体と反応性であるタンパク質を生産するクローンについての選択、である。

cDNA又はゲノム・ライブラリーからの本発明に係るDNA構築物の好ましい単離

方法は、配列番号2-6中に示すDNA配列の又は本発明のDNA構築物によりエンコードされているアミノ酸配列、例えば、配列番号8又は9中に示すようなアミノ酸配列の中のいずれか、又は先に開示した部分的アミノ酸配列(a)-(R)の中のいずれかに基づき調製された縮重オリゴヌクレオチド・ブロームを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用による。例えば、このPCRは、米国特許第4,683,202号中に、又はR.K.Saiki et al. (1988)により記載された技術を使用し行われることができる。

あるいは、本発明のDNA構築物のDNA配列は、確立された標準的な方法、例えば、Beaucage and Caruthersにより記載されたホスホアミジット法(1981)、又はMatthes et alにより記載された方法(1984)により合成的に調製されることができる。

このホスホアミジット法に従って、オリゴヌクレオチドが、例えば、自動DNA合成装置内で合成され、精製され、アニールされ、リゲートされ、そして適当なベクター内でクローン化される。

最終的に、このDNA構築物は、標準的な技術に従って、(適宜)合成、ゲノム又はcDNAの起源の断片、組換えDNA分子全体のさまざまな部分に対応する断片をリゲートすることにより調製された、混合ゲノムと合成、混合合成とcDNA又は混合ゲノムとcDNAの起源を有することができる。

先に述べたように、本発明に係るDNA構築物は、遺伝子修飾されたDNA配列を含んで成ることができる。このような配列は、例えばよく知られた手順に従って相対的組換えのために所望のアミノ酸配列をエンコードしている合成オリゴヌクレオチドを使用した部位指定突然変異誘発により、又は例えば放射線照射を通じてのランダム

突然変異誘発、化学的処理又はランダム・オリゴヌクレオチド・プライマーを使用したPCRの使用により、アミノ酸置換が導入されることが望まれるポリペプチドの部位(単数又は複数)に対応する部位において好適に修飾された、デンプン分解性の、例えば、 α -アミラーゼ活性をエンコードしているゲノム又はcDNA配列に基づき調製されることができる。

このDNA配列の好適な修飾の例は、ポリペプチドの他のアミノ酸配列を生じさせないが、組換えDNA分子がその中に導入される宿主生物のコドンの用い方に対応することができるヌクレオチド置換、又は、先に記載したようなデンプン分解活性及び／又は免疫学的交差反応性に関するポリペプチドに不可欠な特性を弱めずに、異なるアミノ酸配列、そしてそれ故、たぶん、異なるポリペプチド構造を生じさせるヌクレオチド置換である。他の可能性のある修飾の例は、その配列中への1以上のヌクレオチドの挿入、その配列のいずれかの端における1以上のヌクレオチドの付加、及びその配列のいずれかの端又はその内における1以上のヌクレオチドの欠失である。

好ましくは、組換え体発現ベクターである本発明のDNA構築物を担持するベクターは、便利には、組換え体DNA手順に供されることができるいずれかのベクターであることができ、そして発現ベクターの選択は、それがその中に導入されるであろう宿主細胞に、しばしば依存するであろう。従って、このベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の存在物として存在し、その複製が染色体の複製から独立しているベクター、例えば、プラスミド又はバクテリオファージであることができる。あるいは、このベクターは、宿主細胞内に導入されるとき、その宿主細胞ゲノム内に組み込まれ、そしてそれが組み込まれた染色体（単数又は複数）と一緒に複製されることができるものである。

DNA構築物又はベクター中、DNA配列は、好適なプロモーター配列に作用可能な状態で接続されなければならない。プロモーターは、選択の宿主細胞内で転写活性を示すいずれかのDNA配列であることができ、そしてその宿主細胞と同種又は異種のいずれかのタンパク質をエンコードしている遺伝子から得られることができる。本発明のDNA構築物の転写に向けるのに好適なプロモーターの例は、E. コリ (*E. coli*) のlacオペロンのプロモーター、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*) アガラーゼ (agarase) 遺伝子dagAプロモーター、パチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) α -アミラーゼ遺伝子 (amyL) のプロモーター、パチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) のマルトゲニック (maltogenic) アミラーゼ遺伝子 (amyM)

のプロモーター、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus Amyloliquefaciens*) α -アミラーゼ (amyQ) のプロモーター、等である。

本発明のDNA構築物及び／又は発現ベクターは、デンプン分解酵素、例えば、本発明のピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列に作用可能な状態で接続された好適なターミネーターをも含んで成ることができる。好適なターミネーターの例は、バチルス・リケニフォルミス α -アミラーゼ遺伝子のものである。

本DNA構築物及び／又はベクターは、そのベクターが問題の宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列をさらに含んで成る。このような配列の例は、プラスミド pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1、及び pIJ702 の複製起点である。

本DNA構築物及び／又はベクターは、選択マーカー、例えば、その産物が宿主細胞内の欠陥を補なう遺伝子、例えば、バチルス・サ

ブチリス (*B. subtilis*) 又はバチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*) からの dal 遺伝子、又は抗生物質耐性、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール又はテトラサイクリン耐性を付与する選択マーカーをも含んで成ることができる。

例えば、宿主細胞として特定のバクテリアを使用するとき、細胞内発現がいくつかの点で有利であることができるけれども、一般的には、発現が、細胞外であることが好ましい。細胞外発現を得るために、そのDNA構築物及び／又は発現ベクターは、正常には、さらに、ブレ領域、すなわち、発現されたデンプン分解酵素、例えば、ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をその培養基中に分泌することを許容するシグナル・ペプチドを含んで成らなければならない。

デンプン分解酵素、例えば、ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードするDNA配列、プロモーター、ターミネーター及び他の要素をそれぞれリゲートすることを含んで成る本発明のDNA構築物を構築し、そして、それを、複製に必要な情報を含む好適なベクター内に挿入するために使用される手順は、当業者によく知られている（例えば、Sambrook et al. (1989) 参照）。

先に定義したような本発明に係るDNA構築物又は発現ベクターのいずれかを含んで成る本発明の細胞は、本発明のポリペプチドの組換え体生産において宿主細胞として有利に使用される。この細胞は、便利には、そのDNA構築物をその宿主の染色体に組み込むことにより、本発明のDNA構築物により形質転換されることができる。但し、このDNA構築物は、染色体外の存在物として存在することもできる。しかしながら、この組み込みは、一般的に有利であると考えられる。なぜなら、そのDNA配列が、その細胞内でより安定して維持される傾向があるからである。宿主染色体内へのDNA構築物の取

り込みは、常法に従って、例えば、相同的組換えにより行われることができる。あるいは、その細胞は、さまざまなタイプの宿主細胞と関連して以下に記載するような発現ベクターにより形質転換されることができる。

本発明に係る細胞は、高等生物、例えば哺乳動物又は昆虫の細胞であることができるが、好ましくは、微生物細胞、例えば、バクテリア又は（酵母を含む）菌の細胞である。

好適なバクテリアの例は、グラム陽性菌、例えば、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・レンタス (Bacillus lentus)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス・アルカロフィルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・コアギュラン (Bacillus coagulans)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・ラウタス (Bacillus lautus)、バチルス・チューリングエンシス (Bacillus thuringiensis) 又はストレプトミセス・リビダンス (Streptomyces lividans) 又はストレプトミセス・ムリナス (Streptomyces murinus)、あるいはグラム陰性菌、例えば、E. コリ (E. coli) である。これらのバクテリアの形態転換は、例えば、それ自体公知のやり方でプロトプラスト形質転換又はコンピテント細胞の使用により行われることができる。

酵母生物は、好ましくは、サッカロミセス (Saccharomyces) 又はシゾサッカ

ロミセス (Schizosaccharomyces) の種、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) から選択されることができる。糸状菌は、有利には、アスペルギルス (Aspe

rgillus) の種、例えば、アスペルギルス・オリゼ (Aspergillusoryzae) 又はアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) に属することができる。菌の細胞は、それ自体公知のやり方で、プロトプラスト形成及びそのプロトプラストの形質転換その後のその細胞壁の再生を含む方法により、形質転換されることができる。

バチルス・リケニフォルミスの細胞とは異なり、そしてピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNAを含んで成るDNA構築物を宿す、本発明に係る組換え体バチルス細胞は、好ましくは、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・レントス (Bacillus lentus)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stea rothermophilus)、バチルス・アルカロフィルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・ラウタス (Bacillus lautus)、又はバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) の株から選ばれる。

本発明に係る組換え体バチルス細胞内に宿されたDNA構築物は、好ましくは、先に定義したようなDNA構築物であり、その中では、ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列は、ピロコッカス・ウォエセイの株又はピロコッカス・フリオサスの株から、特に、ピロコッカス・ウォエセイ株DSM 3773又はピロコッカス・フリオサス株DSM 3638から、あるいはそれらの α -アミラーゼ生産能力を保持している上記株の突然変異体又は誘導体から得られることができる。

デンプン分解酵素、例えば、ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体を製造するための本発明の方法において、先に定義したよ

うな本発明の細胞は、そのデンプン分解酵素の発現を許容する条件下で好適な培養基中で培養され、そして、得られた酵素は、そのカルチャーから回収される。

これらの細胞を培養するために使用される培地は、問題の宿主細胞の成長に好適ないずれかの慣用の培地であることができる。好適な培地は、商業的な供給者から入手可能であり、又は（例えば、American Type Culture Collectionのカタログ中の）公開されたレシピに従って調製されることができる。

デンプン分解酵素、例えば、ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体は、適宜、細胞の破壊後に、遠心分離又はろ過により培地から細胞を分離し、塩、例えば、硫酸アンモニウムによるその上清又はろ液のタンパク質成分の沈殿、その後の、さまざまなクロマトグラフィー手順、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィー、等による精製を含む慣用の手順によりその培地から回収されることができる。

本発明のDNA構築物によりエンコードされ、そして／又は本発明の方法により生産されたピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体は、 α -アミラーゼ活性が必要とされるいずれかの工程、例えば、ワイン又は果実産業において使用されるデンプン交換又は融解において、パルプ及び製紙工業において使用されるべきデンプンの修飾のために、あるいは、繊維の製造における繊維の糊抜き（desizing）用途のために、使用されることができる。また、本ポリペプチドは、ドウ及び／又はベークされた製品の特性を改良するためのベーキングにおいて、そして例えば洗剤添加物又は洗剤組成物の構成成分としての洗剤目的のために、使用されることができる。他の用途は、生物学的廃棄物の分解、バイオマス交換又は分解、あるいは生物学的材料からのエネルギーの調製を含む。

その高い熱安定性のために、本発明に係るピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体は、高い熱安定性が有利である工程のために特別の用途を有することが企図される。このような工程の例は、例えば、W090/11352（この内容を引用により本明細書中に取り込む。）中に開示されているように行われるデンプン融解（液化）工程である。

より特に、本発明のデンプン液化工程は、デンプンを糖に酵素的に変換するた

めに、例えば、燃料アルコール又は高フルクトース・シロップ (HFS) の生産のために、使用されることができる。好適な液化条件は、100-140℃において120分間以上、より好ましくは、100-120℃において1-60分間、最も好ましくは、105-110℃において1-30分間であり、場合によりその後の、約30-120分間90-100℃のレンジ内で保持されるであろう上記温度の減少である。上記水性デンプン・スラリーにカルシウム塩を添加しないことが好ましい。このpHは、3.5-6.0内、より好ましくは、4.0-5.5、最も好ましくは、4.2-4.8内に保たなければならない。連続工程が好ましく、そして加熱は、最も好ましくは、ジェットクーキングによるものである。本発明の α -アミラーゼ又はその変異体の投与レベルは、典型的には、デンプン1gDS(乾燥物質)当り5-500NU、好ましくは、10-50NUのレンジ内にある。このデンプン濃度は、普通には、15-45%DS(w/w%乾燥物質)、最も普通には25-30%DSのレンジ内にあるであろう。

(NOVO α -アミラーゼ・ユニットの略号である) 活性標準NUは、7-20分間の反応時間にわたり、37℃、pH 5.6及び0.0043MのCa⁺⁺において、1時間当り5.26mgの溶解デンプンを加水分解する酵素の量である。この分析法について記載する折本AF9/6は、NOVO NORDISK A/Sに対する要求に基づき入手可能である。ピロコッカス α -

アミラーゼの活性は、60℃において測定され、そして同一条件下で検定されたTermamyl標準に関係付けられる。

液化したデンプンは、その後、中間のpH調整を実質的に伴わずに、グルコアミラーゼの存在中の酵素的糖化に供されることができる。この場合において、デンプンは、pH 3.5-6.0において、より好ましくは、pH 4.0-4.5、最も好ましくはpH 4.2-4.8において、本発明の α -アミラーゼ又は変異体により融解される。この液化デンプンは、枝切断酵素、例えば、プルラナーゼ(pullulanase、詳細についてはEP 63 909を参照のこと。)との組み合わせにおけるグルコアミラーゼ及び/又は例えば、アスペルギルス・ニガー(詳細については、EP 140 410を参照のこと。)からの酸安定 α -アミラーゼの存在中、その後の酵素的糖化に供されることもできる。

本発明の液化方法は、エタノールの製造のために使用されることもできる。この場合において、デンプンは、3.5-6.0の、より好ましくは、4.0-5.5のpHにおいて α -アミラーゼにより、その後の、グルコアミラーゼによる糖化及び酵母による同時又はその後の発酵により液化される。その後、アルコールは、本分野において公知の方法により回収されることができる。好ましくは、中間のpH調整のいずれをも伴わずに約4.5のpHにおいて行われ、そして同時糖化及び発酵が96時間までの間30-35℃において行われる。この液化は、低いDSレベル（15-20%）又は高いDSレベル（20-40%）のいずれかにおいて行われることができる。この高いDS工程においては、そのDSレベルは、ほとんどの酵母が耐えることができるほぼ最大である約10容量%のアルコールを得るために、発酵に先立って約20%まで減少されなければならない。

アルコール製造のための原材料は、精製デンプン、例えば、湿式粉碎トウモロコシ・デンプン；生の未加工材料、例えば、トウモロ

コシ（corn）、小麦、米、ソールガム、カッサバ（cassava）及びポテト（これらのデンプン含量は、15~80%のレンジにある。）；並びに工業からの廃棄物及び副生成物のような物質を含む他のデンプンを含むことができる。

さらに、このデンプン液化は、

a) 場合により、好適な発現ベクター内に存在する、ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしている本発明に係るDNA構築物を、好適な宿主生物内に、挿入し、

b) そのピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の発現を許容する条件下、好適な培養基中で、その宿主生物を培養し、そしてそのカルチャーから、得られたピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体を回収し、そして

c) 上記段階のそれぞれを先に記載したように行いながら、水性デンプン・スラリーを、段階b)において回収したピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の存在中での酵素的液化に、供する、

を含んで成る工程により、行われることができる。

図面の簡単な説明

本発明を、添付図面を参照しながら、以下に記載する。ここで、

図1は、そのヌクレオチド配列を配列番号7中に示す、プラスミドpSJ1678を表し、

図2は、プラスミドpSJ2467を表し、

図3は、プラスミドpSJ2481を表し、

図4は、プラスミドpSJ2482を表し、

図5と6は、実施例5中に記載するサザン分析の結果を表し、

図7は、プラスミドpSJ2487とpSJ2488を表し、

図8は、プラスミドpSJ2489とpSJ2490を表し、

図9は、実施例6中にさらに記載するような本発明に係るDNA構築物の α -アミラーゼ活性を表し、そして

図10と11は、それぞれ、24と48時間にわたり本発明に係るDNA構築物によりエンコードされた α -アミラーゼに晒されたデンプンから得られたオリゴ糖の分布を表すクロマトグラムである。

以下の略号を、プラスミド図上で使用する：

rep	pUB110 Repタンパク質のための遺伝子 (Gryczyn et al., 1978)
cat	pC194からのクロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼのための遺伝子 (Horinouchi and Weisblum, 1982)
p15A Ori	E. コリ (<u>E. coli</u>) のクリプティック (cryptic) プラスミドからの複製機能 (Chang and Cohen, 1978)
PamyM	バチルス・ステアロサーモフィルス (<u>Bacillus</u> <u>tearothermophilus</u>) からのプロモーター領域 (Diderichsen and Chnistiansen, 1988)
KanD	それ自体のプロモーターについて欠失されたpUB110からのカナマイシン耐性遺伝子

pUB110 Ori	pUB110のための2本鎖複製起点
amyA・pfu	ピロコッカス・フリオサス (<u>Pyrococcus furiosus</u>) からのアルファアミラーゼ遺伝子
bla	pUCプラスミドからのベクターラクタマーゼ遺伝子 (Yanish-Perron et al., 1985)
Plac	pUCプラスミドからのベクターガラクトシダーゼ・プロモーター

' amyA・pfu 5' 末端内で切り詰められたamy・pfu遺伝子

amyA-pfu' 3' 末端内で切り詰められたamyA-pfu遺伝子

本発明を、本明細書中に定義するように本発明の範囲をいずれの方法によるかを問わず限定することを意図されない以下の実施例により、さらに説明する。

材料及び方法

バクテリア

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germanyから入手可能なピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) DSM3638及びピロコッカス・ウォエセイ (Pyrococcus woesei) DSM3773。

これらの株を、その株と一緒に上記DSMから供給されるような記載に従って培地中で成長させた。

E. コリ (E. coli) SJ2は、Diderichsen et al., 1990により記載されており、そして細胞を、供給者により記載されたようにBIO-RADからのGene PulserTMエレクトロポレーターを使用したエレクトロポレーションのために調製し、そして、それにより形質転換した。

バチルス・サブチリス (B. subtilis) DN1885は、Diderichsen et al., 1990により記載されており、そしてコンピテント細胞を、Yasbin et al., 1975により記載されるように調製し、そして形質転換した。

プラスミド

pSJ1678 (図1) を、遺伝子ライブラリーの構築におけるクローニング・ベクターとして使用した。pSJ1678の全体配列を、添付の配列番号7中に与える。

pUC19 (Yanish-Perron et al., 1985) を、サブクローニングの

ために使用した。

一般的方法

上記プラスミドを構築するために使用した実験技術は、組換えDNA技術の分野内の標準的な技術であった。Sambrook et al., 1989を参照のこと。

制限エンドヌクレアーゼを、New England Biolabs及びBoehringer Mannheimから購入し、そしてその製造者により推奨されるように使用した。T4 DNAリガーゼを、New England Biolabsから購入し、そしてその製造者により推奨されるように使用した。

全ての株からのプラスミドDNAの調製を、Kieserにより記載された方法、1984により行った。

アミラーゼ活性は、Phadebas錠剤 (Phadebas® アミラーゼ・テスト; Pharmacia Diagnostics, SW) を使用して、620nmにおける吸収/mlとして測定されることができる。この検定を、請求により入手可能なNovo Nordisk AF出版物AF-207/-GB中に記載された手順に従って、0.15mMカルシウムの存在中、60℃、pH 7.3において15分間、行う。この酵素活性を、酵素標準の活性と比較し、そしてその結果を、その酵素標準のものと同一のユニットにおいて表した (例えば、本明細書中に定義したようなNU)。

培地

プラスミド調製のための液体カルチャーを、適当な抗生物質を補ったTY培地中で成長させた。

トリプチカーゼ (Trypticase)	20 g / l
酵母エキス	5 g / l
FeCl ₂ · 4H ₂ O	6 mg / l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1 mg / l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15 mg / l
pH	7.3

酵素生産及び特徴付けのための液体カルチャーを、関連抗生物質を補ったTerrificブロス中で成長させた。

バクトートリプトン	12g
バクト酵母エキス	24g
グリセロール	4ml
水	900mlまで

オートクレーブ後、100mlの以下の別々にオートクレーブした溶液を添加した。

KH_2PO_4	0.17M
K_2HPO_4	0.72M

固体培地は、LB寒天であった。

バクトートリプトン	10g / l
バクト酵母エキス	5g / l
NaCl	10g / l
バクト寒天	15g / l

NaOHによりpH 7.5に調整した。

アミラーゼ活性の可視化のための培地は、以下のように調製した10mlの染色されたアミロペクチン溶液を、500ml寒天当りに含むLB寒天であった。

12.5gのアミロペクチン (Serva 2000-4000kD) を、250ml水中に沸騰により溶解し、室温まで冷却し、30ml 4M NaOHと2.5g Cibacron Rot Bを添加し、そしてその溶液を一夜インキュベートした。pHを、4M HClにより7に調整する。500mlの96%エタノールを、攪拌しながら添加して、赤色の粘性沈澱物としてアミロペクチンを沈澱させる。その上清を、捨て、そのアミロペクチンを、わずかな加熱により200mlの水中に溶解し、そしてエタノールによる沈

澱を繰り返す。このアミロペクチンを再び200mlの水に溶解し、オートクレーブにかけ、そして使用に備える。

実施例

実施例 1

ピロコッカス・フリオサス α -アミラーゼ遺伝子のクローニング

ピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) DSM 3638からのゲノムDNAを、Pitcher et al., 1989の方法により単離した。約100 μ gのDNAを、Sau3Aにより部分消化し、スクロース勾配上でサイズ分画し、そして3~7kb間の断片をブールした。

クローニング・ベクターpSJ1678を、BamHIにより消化し、そして3.8kb断片を、アガロース・ゲルから精製した。約0.75 μ gベクター断片を、約4 μ gのサイズ分画されたP. furiosusの染色体DNAにリゲートし、そしてエレクトロポレーションによりE. coli SJ2を形質転換するために使用した。

遺伝子バンクを、10 μ g/mlのクロラムフェニコールを補い、そして染色されたアミロペクチンを含むLBプレート上にプレートした。37℃において一夜インキュベートした後、それぞれのプレートを、2つの新たなプレート上にレプリカ・プレートし、そしてそれを次に、37℃において一夜インキュベートした。これらの中の1を、その後、一夜60℃においてインキュベートした。

アミロペクチンの分解を示す透明の輪 (clear halos) が、60℃のプレート上 (全部で10000の中の) 5コロニーの周囲に観察され、一方、37℃に維持されたプレート上のコロニーの周囲には輪は全く観察されなかった。これらの37℃プレートから採取したこれらの5株を、SJ2463-SJ2467として保存した。

制限消化は、4クローン、SJ2463, SJ2464, SJ2465及びSJ2467上

のP. furiosus DNA挿入物が、その挿入物が全体として同一ではないが共通のDNA領域を共有していることを現わし、一方、pSJ2466上に含まれるDNAは、これらの4クローンと無関係であるようであった。pSJ2467 (図2) は、約4.5kbの挿入物を含み、そしてさらなる分析のために使用された。

実施例 2pSJ2467から生産されたアミラーゼを使用したデンプン分解

E. coli SJ2467 (pSJ2467を宿す先に記載したE. coli SJ2) を、37℃において3日間、6 μ g/mlクロラムフェニコールを補ったTerrificブロス培地中で成長させた。その培養ブロス中のE. coli細胞を、音波処理により溶解させた。

1 のサンプルを直接的に滅菌ろ過し、他のサンプルを短時間の熱処理後に滅菌ろ過した。

2 g のモチ・トウモロコシ (waxy corn) デンプンを、180×18mmガラス培養管内で、40ppmのCa⁺⁺を含むpH値4.3, 5.0と5.5の、10mlの0.1Mアセテート・バッファーによりスラリーとした。約2NU/mlのピロコッカス・フリオサス・アミラーゼを含む2mlの熱処理(105℃、5分間) *E. coli*音波処理抽出物を、添加し、そしてそのpHを、周囲温度において調整した。

この密封ガラス管を、105℃における定熱油浴に移し、そして激しく攪拌した。ゲル化の数分以内に、そのデンプンは液化した。サンプルを定期的に取り出し、そしてヨウ素(5ml脱イオン水中の1滴の0.1Mヨウ素)によりテストした。以下の結果を得た。

サンプル	時間 (時間)	pH	ヨウ素、色
pH 4.6	0.5 6 24	— — 4.5	紫 赤 茶
pH 5.3	0.5 6 24	— — 5.1	紫 赤 茶
pH 5.5	0.5 6 24	— — 5.4	紫 赤 茶

上記テストは、*E. coli*内で発現された*P. furiosus*アミラーゼが、活性であり、高温及び低pHにおいて、デンプンの存在中、安定である、ということを立証している。

さらに、上記テストは、*E. coli*内で活性形態における極めて好熱性の*P. furiosus*アミラーゼの発現を得ることができるということを立証している。その生来の環境において合成され、分泌され、そして100℃において活性な3次構造に折り畳まれているピロコッカス α -アミラーゼが、37℃においても活性形態で生産されることができるといことが恐ろくべきことに考えられる。

さらなる実験において、2 g のトウモロコシ・デンプンを、180×18mmガラス

培養管内で、2 mlの1 Mアセテート・バッファー、pH5.5によりスラリーとした。約1 NU/mlのP. furiosusアミラーゼを含む10mlのE. coli音波処理抽出物を添加し、そしてそのpHを周囲温度において5.5に調整した。

この密封ガラス管を、105℃における定熱油浴に移し、そして激しく攪拌した。ゲル化の数分以内に、そのデンプンは液化した。サンプルを定期的に取り出し、そしてヨウ素（5 ml脱イオン水中の1滴の0.1Mヨウ素）によりテストした。サンプルをHPLC分析のためにも採取した。以下の結果を得た。

時間（時間）	pH	ヨウ素、色
1	—	赤
2	—	茶／赤
24	5.2	黄
48	4.8	黄

図10と11中に示すクロマトグラム中に見られるオリゴ糖の分布は、エンドーアミラーゼ攻撃の典型である。長い加水分解の間に形成された主なオリゴ糖は、DP5、DP6及びDP7である（ここで、DP＝重合度）。

実施例 3

P. furiosus α -アミラーゼ遺伝子のサブクローニング

pSJ2467をCla Iにより消化し、そして α -アミラーゼ遺伝子を含む4.5kb断片を、Acc I消化pUC19 DNAとリゲートし、そしてリゲーション混合物をE. coli SJ2に形質転換した。そのクローニング・ベクターに対して2つの可能な方向のそれぞれにおいてその挿入物を含む形質転換体を得られた。これらは、pSJ2481（図3）を含むSJ2481、及びpSJ2482（図4）を含むSJ2482であった。

両方のクローンは、60℃におけるインキュベーションの後に染色されたアミロペクチン・プレート上での透明の輪の出現により可視化されるように α -アミラーゼを生産する。このアミラーゼー産生形質転換体は、pUC19ベクター・プラスミドだけを含む形質転換体と比べていくぶん病的に見える。それらは、より小さく、より半透明なコロニーを形成する。

さらなるサブクローニングを、pSJ2481から行った。pSJ2487 (図7) を、pSJ2481からの1 kb Xba I 断片の欠失及びE. coli SJ2内への再リゲート・プラスミドの形質転換により行った。得られた

形質転換体は、染色されたアミロペクチンを含むLBプレート上で輪を作り出すことができず、このことは、上記の欠失が、活性アミラーゼ・タンパク質の発現に重要なDNA領域を除去したということを示している。

pSJ2481からの1 kb Xba I 断片を、Xba I 消化pUC19内に挿入して、pSJ2489とpSJ2490 (同じ図8) を得た。

実施例 4

DNA配列

pUC19内の数サブクローン上の挿入物の端を、そのpUC19マルチリンカー領域のちょうど外側にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド・プライマー及びSequenase™を使用して2本鎖プラスミド上で直接的に、配列決定した。

得られた配列を、配列番号2, 3, 4, 5及び6中に与える。

配列番号2は、pSJ2490から得られ、そしてpUCポリリンカー内のEcoRI部位の次の挿入物の端から読まれる。

配列番号3は、pSJ2489から得られ、そしてpUCポリリンカー内のHindIII部位の次の挿入物の端から読まれる。

配列番号4は、pSJ2487から得られ、そしてpUCポリリンカー内のEcoRI部位の次の挿入物の端から読まれる。

配列番号5は、pSJ2482から得られ、そして上記ポリリンカー内のEcoRI部位の次の挿入物の端から読まれる。

配列番号6は、pSJ2482から得られ、そしてpUCポリリンカー内のHindIIIの次の挿入物の端から読まれる。

本明細書中に与えるDNA配列に基づき、PCR反応においてピロコックス・フリオサスの染色体DNAからpSJ2467及びpSJ2481/2482上に含まれるピロコックス・フリオサスDNA挿入物の全体を増幅するために使用されることが出来るオリゴヌクレオチド・プライマー

を合成し、それにより、入手可能な材料からこれらのプラスミドを再構築することができであろう。

実施例 5

サザン分析

pSJ2481を、Amershamから得た商業的キットを使用してニックートランスレーションにより³²P-ラベルし、そしてサザン分析におけるプローブとして使用した。ハイブリダイゼーションは、一夜、60℃における、10×Denhardt's溶液、1% SDS、10mM EDTA及び5×SSC中、その後の、2×SSC、0.1% SDS中室温における2回の15分間洗浄、そして60℃における1回の15分間の洗浄であった。得られた露出物を図5と6中に示す。

図5は、

- 1) pSJ2463, pSJ2464, pSJ2465及びpSJ2467が先に述べたような共通DNA領域を含むこと(約0.5kbのHindIII断片がpSJ2463(レーン1)、pSJ2464(レーン2)、pSJ2465(レーン3)、pSJ2467(レーン5)及び染色体P. furiosus DNA(レーン7)に共通である。)
- 2) pSJ2481上の挿入物が、P. furiosusの染色体(レーン7)から得られることを表している。

図6は、

- 3) 相同DNA領域が、P. woeseiの染色体内に存在すること(染色体P. woesei DNAはPitcher et al. 1989に従う方法により単離されている。)
- を表している。従って、pSJ2481は、HindIII消化P. furiosus DNA(図5、レーン7)内のものとまったく同一の、HindIII消化P. woesei DNA(レーン2)内の断片にハイブリダイズする。明確さのために

、レーン2のより長い露出を、図6のレーン0として加えて、0.5kbのHindIII断片を表す。

pSJ2481、又はpSJ2481から得られる本明細書中に得られる配列情報は、それ故に、P. furiosus又はP. woeseiのいずれかの染色体からのα-アミラーゼ遺伝子

を同定し、そしてそれによりそのクローニングを支援するための道具として使用されることができる。

実施例 6

バチルス・サブチリス内での α -アミラーゼ遺伝子の発現

遺伝子ライブラリーの構築のために使用したプラスミドpSJ1678は、E. coliとB. subtilisの両方の中で複製することができるシャトル・ベクターである。

B. subtilis内でのアミラーゼ活性の発現についてテストするために、pSJ2467を、それ故、DN1885のコンピテント細胞に形質転換して、染色されたアミロペクチンを含むLBプレート上でのクロラムフェニコール ($6 \mu\text{g}/\text{ml}$) に対する耐性について選択した。10の形質転換体を、対照としてDN1885/pSJ1678であるSJ1678と一緒に、染色されたアミロペクチンを含む新たなプレート上に拾い上げた。37℃において一夜インキュベートした後、1のプレートを65℃に移し、一方、他を、37℃に維持した。7時間後、pSJ2467による10の形質転換体の周りのアミロペクチンの分解は、透明な輪の形成として、65℃においてインキュベートされたプレート上で明らかであった。対照株の周りには、輪は全く形成されなかった (図9)。

ピロコッカス α -アミラーゼ遺伝子からのアミラーゼ活性の発現が、例えば、翻訳のより効率的な開始を可能にするリボソーム結合部位の修飾又は置換の形態における、その遺伝子の修飾のいずれをも伴わずに、バチルス・サブチリス内で獲得されることができるという事実は、まったく恐ろくべきことである。一般的には、非-グ

ラム陽性菌からクローン化された遺伝子のほとんどは、B. subtilis内でのそれら自身の発現シグナルからの発現に失敗し (Mountain, A., 1989)、そしてB. subtilis内でのピロコッカスからの遺伝子の直接発現に関する先の報告は我々の知る限り全く存在しない。

実施例 7

pSJ2467上でクローン化された4.5kbのP. furiosus DNA挿入物 (実施例1) を、SequenaseTM並びに先に決定された配列に基づくサブクローンとオリゴヌクレ

オチド・プライマーとの組み合わせを使用して、両ストランドに対して配列決定した。

α -アミラーゼ遺伝子に対応するオープン・リーディング・フレームをサブクローニングにより位置決めした (α -アミラーゼを生産する個々のサブクローンの能力を、染色されたアミロペクチンを含むプレート上で検定した。)。

このオープン・リーディング・フレームによりエンコードされた α -アミラーゼは、バクテリア、昆虫及び植物を含むさまざまな生物からの α -アミラーゼ及び他のデンプン分解酵素に対する相同性を現した。B. licheniformis α -アミラーゼと並べられたとき、その配列内のさまざまな部位において18ギャップが導入されるとき約36%の同一性の程度が観察されることができるとであろう。

そのシグナル・ペプチド・コーディング領域を含む α -アミラーゼ・コーディング領域のDNA配列を、配列番号1中に示す。配列番号1中に示すDNA配列に基づき、そのシグナル・ペプチド (配列番号8) とその成熟 α -アミラーゼ (配列番号9) のアミノ酸配列を演繹した。

pSJ2467のマッピング (図2) 上、反時計廻りに読んで、 α -アミラーゼ遺伝子は、4.5~3.0位の間に位置する。

本明細書中に引用した文献

S.L.Beaucage and M.H.Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp.1859-1869、又は、Matthes et al., The EMBO J. 3, 1984, pp.801-805により記載された方法。

Brown et al., Applied and Environmental Microbiology, July 1990, pp.1985-1991

Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. (1978) . p15Aクリプティック・ミニプラスミドから得られた増幅可能なマルチコピーDNAクローニング媒体の構築及び増幅、J. Bacteriol., 134, 1141-1156.

Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B.R., Sjöholm, C. (1990) . α -アセトラクテート・デカルボキシラーゼ、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) からのエキソ酵素をエンコードしているaldBのクローニング、J

.Bacteriol., 172, 4315-4321.

Diderichsen, B. and Christiansen, L. パチルス・ステアロサーモフィルスからマルトゲニック α -アミラーゼのクローニング。FEMS Microbiol.Lett. 5653-60, 1988.

Gryczan, T. et al. (1978) . パチルス・サブチリス内への形質転換により導入されたスタフィロコッカス・アウレウスの特徴付け、J.Bacteriol., 134, 318-329.

Horinouchi et al. (1982b) "Nucleotide sequence and functional map of pEl 94, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics" J.Bacteriol., 150, 804-814.

Hudson et al., 1989, Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications.

Kieser, T. (1984) . ストレプトミセス・リビダンス及びエチリキア

・ コリからのCCC DNAの単離に影響を及ぼす因子、Plasmid 12, 19-36.

Koch et al., FEMS Microbiology Letters 71 (1990) 21-26

Lipman and Pearson (1985), Science 227, 1435 (1985)

Matthes et al., EMBO J. 3, 1984, pp.801-805

Mountain, A. (1989) . In "Biotechnology Handbooks Vol.2. Bacillus" Ed. Harwood, C.R. Plenum Press, New York, 1989, pp73-114.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J. (1989) . グアニジウム・チオシアネートによるバクテリアのゲノムDNAの迅速抽出、Lett.Appl.Microbiol., 8, 151-156.

Podkovyrov, Journ. of Bacteriol., 1992, Vol.174, pp.5400-5405.

R.K.Saiki et al., Science 239, 1988, pp.487-491.

Sambrook et al., Molecular Cloning A laboratory manual, 2ndEd., Cold Spring Harbor, 1989.

Svensson, B., FEBS Letters, 1988, Vol.230, pp.72-76.

Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) . 改良されたM13ファ-

ジ・クローニング・ベクター及びM13 mp18及びpUC19ベクターの宿主株ヌクレオチド配列、Gene 33, 103-119.

Yasbin, R.E., Wilson, G.A., Young, F.E. (1975) . パチルス・サブチリスの溶原性株内での形質転換及びトランスフェクション、コンピテント細胞内のファージの選択的導入のための証拠、J.Bacteriol., 121, 296-304.

Zhou, FEBS Letters, 1989, Vol.255, pp.37-41.

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人

(A) 名称 NOVO NORDISK A/S

(B) 街 Novo Alle

(C) 市 Bagsvaerd

(E) 国 デンマーク

(F) 郵便番号 DK-2880

(G) 電話 +45 44448888

(H) ファックス +45 4449 3256

(I) テレックス 37304

(ii) 発明の名称 デンブン分解酵素

(iii) 配列の数 52

(iv) コンピュータ読み込み形態

(A) 媒質タイプ フロッピー・ディスク

(B) コンピュータ IBM PC互換性

(C) オペレーティング・システム PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア PatentIn Release# 1.0, Version# 1.25

(EP0) Nove Nordisk A/S

(2) 配列番号 1 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 1380塩基対

- (B) タイプ 核酸
- (C) 鎖 1 本鎖
- (D) トポロジ 線状
- (ii) 分子タイプ DNA (ゲノム)
- (vi) 起源

(A) 生物 ピロコッカス・フリオサス

(B) 株 DSM 3638

(xi) 配列番号 1

GTGAACATAA	AGAAATTAAC	A000CTOCTA	ACTCTATTAC	TGTTTTTTAT	AGTACTAGCA	60
AGTOCAGTAA	GTCGAGCAAA	ATACITGGAG	CTTGAAGAGG	GAGGAGTTAT	AATGCAAGCA	120
TTCTATTGGG	ATGTTTCAGG	GGGAGGAATT	TGGTGGGATC	ATATAAGATC	GAAGATTCTT	180
GAATGGTATG	AAGCTGGANT	CTCTGCAATA	TGGCTAOCCT	CACCAAGCAA	GGGGATGAGT	240
GGAGGATATT	CAATGGGCTA	CGATOOCTAT	GATTACTTTG	ATCTGGGOGA	GTACTAOCAG	300
AAGGGAACTG	TAGAGAOGCG	TTTIGGATCA	AAAGAAGAAC	TAGTCAGATT	GATACAAACT	360
GOOATGCOCT	ATGGAATAAA	GGTAANTOGC	GATGTAAGTA	TAAACACAG	GGCTGGTGGT	420
GAOCTAGAAT	GGAAOOOCTT	OGTGGAGAT	TACACATGGA	CAGACTTTTC	TAAAGTTGOC	480
TCAGGGAAAT	ATACAGCTAA	CTATCTGGAC	TTGCATOCOA	AAGAGCTTCA	TTGTGTGTGAC	540
GAAGGAOCT	TTGGAGGATT	TOCAGATATA	TGTCATCACA	AAGAGTGGGA	TCAGTACTGG	600
CTATGCAAGA	GCAATGAGAG	TTATGCTGCT	TATTTAAGAA	GCAATAGGATT	TGATGGTTGG	660
AGATTTGACT	ATGTTAAGGG	CTATGGAGCT	TGGTGTGTCA	GAGACTGGCT	TANTTGGTGG	720
GGAGGTGGG	CAGTTGGAGA	GTACTGGGAC	ACAAATGTAG	ATGCACIAC	AAGCTGGGCA	780
TATGAGAGTG	GTGCAAGGT	CTTTGACTTC	COGCTIAC	ATAAAATGGA	TGAAGCATTT	840
GACAAACA	ACATTOCAGC	ATTAGTCTAT	GOOCTACAA	AOGGACAAAC	TGTAGTTTGG	900
AGAGATCCAT	TTAAGGCAGT	AACITTTGTT	GOCATCAITG	ACACAGATAT	AATATGGAAC	960
AAGTATOCAG	CATATGCGTT	CATATTGACA	TATGAGGGAC	AGCCAGTAA	ATTCTACAGG	1020
GACITTTGAGG	AATGGCTGAA	CAAGGATAAG	CATATTAACC	TCATTTGGAT	CCATGATCAT	1080
TTGGCAGGAG	GAAGCACAAC	AATTTGTCTAC	TACGACAAAG	ATGAGCTCAT	ATTGTGTGAG	1140
AATGGAGATT	CTAGAAGGOC	TGGGCTTATA	ACTTACATTA	ACTTGAGCOO	TAACTGGGTT	1200
GGTAGGTGGG	TATACGTTTC	AAAGTTTGCA	GGGGCTTGTA	TTCATGAATA	CACTGGAAAC	1260
CTAGGAGGAT	GGTAGATAA	AAGAGTAGAT	AGTAGGGGAT	GGGTATAOCT	AGAGGCACCA	1320
OCTACGATC	CAGCTAACCG	CTACTATGGG	TACTOOGTAT	GGAGTTATTTG	TGGTGTTTGGG	1380

(2) 配列番号 2 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 303塩基対

(B) タイプ 核酸

(C) 鎖 1 本鎖

(D) トポロジ 線状

(ii) 分子タイプ DNA (ゲノム)

(vi) 起源

(A) 生物 ピロコッカス・フリオサス

(B) 株 DSM 3638

(xi) 配列番号 2

TCTAGAACTCT	CCATTTCCTCA	CAAATATGAG	CTCATCGTTTG	TGGTAGTACA	CAATTGTTGT	60
GCTTCCTCTCT	GCCAAATGAC	TATGGATCCA	AATGAGGTTA	ATTAGCTTAT	CCTTGTTTCAG	120
CCATTTCCTCA	AAGTCCCTGT	AGAATATTAC	TGGCTGTGTC	TCATATGTC	ATATGAACGC	180
ATATGCTTGA	TACTTGTTC	ATATTATATC	TGTTGTCATG	TTGGCAACGA	AAGTACTGOC	240
TTAAATGGAT	CTCTCGAAC	TACAGTTTGT	AACGTTTCTA	GGCATAGAC	TAATTAGCTG	300
GAA						303

(2) 配列番号 3 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 117塩基対

(B) タイプ 核酸

(C) 鎖 1本鎖

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ DNA (ゲノム)

(vi) 起源

(A) 生物 ピロコッカス・フリオサス

(B) 株 DSM 3638

(xi) 配列番号 3

GATCAAGTGA	ACATAAGAA	ATTAGACCC	CTCTTACTC	TATTACTGTT	TTTTATAGTA	60
CTAGCAAGTC	CAGTAGTGA	GCAAAATACT	TGGAGCTTGA	AGAGGGANGA	GTTATAA	117

(2) 配列番号 4 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 207塩基対

(B) タイプ 核酸

(C) 鎖 1本鎖

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ DNA (ゲノム)

(vi) 起源

(A) 生物 ピロコッカス・フリオサス

(B) 株 DSM 3638

(xi) 配列番号 4

TCTAGAAGGC	CUGGGCTTAT	AACCTACATT	AACCTGAGOC	CTAAGTGGGT	TGGTAGGTGG	60
GTATACCTOC	AAAGTTTGCA	GGGGCTTGTA	TCATGAATAC	ACGGAAACCT	AGGAGGATGG	120
GAGATAAAG	AGTAGATAGT	AGGGGATGGG	TATACTAGA	GGCACTACT	CACGATOCAG	180
CTAAGGGCTA	CTATGGGTAC	TGGTAT				207

(2) 配列番号 5 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 237塩基対

(B) タイプ 核酸

(C) 鎖 1本鎖

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ DNA (ゲノム)

(vi) 起源

(A) 生物 ピロコッカス・フリオサス

(B) 株 DSM 3638

(xi) 配列番号 5

GATCCAAAGT	GTTATCTCGA	AATGGGTAGA	ACAATAGGTC	TGAAGAAATT	GGGACATCTT	60
TTGTTATATC	AGTATGGGTA	CTTGATTACG	AAAATAAAAA	GCCTACAGA	GGATTCACTA	120
TAGTGAATTA	TGAATCAAG	GACATGAGAA	AGGGGTTCAA	AAAAATAGIT	AAGGTAAATA	180
TTTCAAAACT	ACCTTCAGC	GAACITGGAT	CTAATAGAAC	AGCATTCATT	TCAAGGG	237

(2) 配列番号 6 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 192塩基対

(B) タイプ 核酸

(C) 鎖 1本鎖

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ DNA (ゲノム)

(vi) 起源

(A) 生物 ピロコッカス・フリオサス

(B) 株 DSM 3638

(xi) 配列番号 6

GATCAGTGA	ACATAAGAA	ATTAAQNOOC	CTCTAACTC	TATTACTGTT	TTTTATAGTA	60
CTAGCAAGTC	CAGTAAGTGC	AGCAAAATAC	TTGGAGCTTG	AAGAGGGAGG	AGTTATAATG	120
CAAGCATTCT	ATTGGCATGT	TCCAGGNGCA	GGATTGGTG	GGATCATATA	AGATOGAAGA	180
TTCTGGAATG	GG					192

(2) 配列番号 7 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 4679塩基対

(B) タイプ 核酸

(C) 鎖 1本鎖

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ DNA (ゲノム)

(xi) 配列番号 7

GAATTCGGGC	CCAAAGATGG	CTGATTTCGG	GGTIGACGGC	GGGCGGAACC	AAGCGGTGAT	60
CGGTGGGGCG	AAATGAAGGC	CTGGGGGAG	TGCGGGGCTT	CTGTTTTGAG	GATTATAATC	120
AGAGTATATT	GAAAGTTTGG	CGATCTTTTC	GTATAATTGT	TTTAGGCATA	GTGCAATCGA	180
TAAGCTTGGC	TGCAGGTGGA	CGGATCGGCG	GGTACCGATT	CTTATTTAGA	AAAGCAATTC	240
TAAATTTATC	TGAAAAGGGA	ATGAGAATAG	TGAATGGACC	AATAATAATG	ACTAGAGAAG	300
AAAGAATGAA	GATTGTTTAT	GAAATTAAGG	AAGCAATATT	GGATAAATAT	GGGGATGATG	360
TTAAGGCAT	TGGTCTTTAT	GGCTCTCTTG	GTGCTCAGAC	TGATGGGGCC	TATTGGGATA	420
TTGAGATGAT	GTTGTTTATG	TCAACAGAGG	AAGCAGAGTT	CAGOCATGAA	TGGACAAACG	480
GTCAGTGGAA	GGTGGAGTGG	AATTTTGATA	GCGAAGAGAT	TCTACTAGAT	TATGCACTCTC	540
AGGTGGATTC	AGATTGGGCG	CTTACACATG	GTCAATTTTT	CTCTATTTTG	CGGATTTATG	600

ATTGAGGTGC	ATACTTAGAG	AAAGTGTATC	AAACGTCTAA	ATCGGTAGAA	GOCCAAAGCT	660
TOCAAGATGC	GATTTGTGCC	CTATGTGTAG	AAGAGCTGTT	TGAATATGCA	GGCAAATGCC	720
GTAAATATGC	TGTGCAAGGA	COGACAACAT	TTCTACCATC	CTTGACTGTA	CAGGTAGCAA	780
TGGCAGGTGC	CATGTTGATT	GGTGTGCATC	ATCGCATCTG	TTATACGAGC	AGCGCTTCCG	840
TCTTAACTGA	AGCAGTTAAG	CAATCAGATC	TTCTTTCAGG	TTATGACCAT	CTGTGCGAGT	900
TGGTAATGTC	TGGTCAACTT	TOGACTCTCG	AGAATCTTCT	GGATGCGCTA	GAGAATTTCT	960
GGATGGGAT	TCAGGAGTGC	ACAGAAAGAC	ACGGATATAT	AGTGGATGTC	TCAAAAAGCA	1020
TACCATTTTG	AAGCATGACC	TCTAATAATT	GTTAATCATG	TTGGTTAGCG	GGATCGGTGC	1080
ACCTGCAGOC	AAGCTTATCG	ATTGCACTAT	GOCTAAAACA	ATTATACGAA	AAGATCGGCA	1140
AACTTTCAAT	ATACTCTGAT	TATAATCTCT	AAAACAGAAC	GOCCGCACTC	GOCCGAGGOC	1200
TTCAATTTCC	CGACCGATC	ACCCCTTGCT	TOCGCGGGC	GTCAAACCGG	AAATCAGGCA	1260
TGGTTGGGOC	GGAAATAGAT	CTAGCATGOC	TTTTAGTCCA	GACCAAATC	CTTTAAGGTG	1320
AGTTTTGTGT	CCACTGAGCG	TCAGACCCCT	TAATAAGATG	ATCTTCTTGA	CATCTTTTTC	1380
GTCTGCGGCT	AATCTCTTGC	TCTGAAAAGC	AAAAAACCGC	CTTGCAGGGC	GGTTTTTTCA	1440
AGGTTCTCTG	AGCTAOC AAC	TCTTTGAACC	GAGGTAACTG	GCTTGGAGCA	GCGCAGTCAC	1500
CAAAACTTGT	CTTTTCAGTT	TAGCCTTAAC	CGCGGCATGA	CTTCAAGACT	AACCTCCTTA	1560
AATCAATTAC	CAGTGGCTGC	TGCCAGTGGT	GCTTTTGCAT	GTCTTTCCGG	GTTGGACTCA	1620
AGACGATAGT	TACCGGATAA	GGCGCAGGGG	TOGGACTGAA	CGGGGGGTTT	GTGCATACAG	1680
TOCAGCTTGG	AGCGAACTGC	CTACCCCGAA	CTGAGTGTCA	GGCTGGGAAT	GAGACAAAGC	1740
CGGCCATAAC	AGCGGAATGA	CACCGGTAAA	CCGAAGGCA	GGACAGGAG	AGCGCAAGAG	1800
GGAGCGGACA	GGGGGAAAGC	CGTGGTATCT	TTATAGTCTT	GTCCGGTTTC	GCCACCACTG	1860
ATTTGAGGCT	CAGATTTGCT	GATGCTTGTC	AGGGGGGGGG	AGCCTATGGA	AAAAAGGCTT	1920
TGCGCGGGOC	CTCTCACTTC	CGTGTAAAGT	ATCTTCTGCG	CATCTTCCAG	GAAATCTCCG	1980
CCCGGTTGCT	AAGCATTTTC	CGCTCGGGCC	AGTGGAAAGA	CCGAGGATAG	CGAGTCAGTG	2040
AGCGAGGAAG	CGGAATATAT	CCGTATATAC	ATATTCTGCT	GAAGCACCGG	TGCAGGCTTT	2100
TTCTCTCTGC	CACATGAAGC	ACTTCACCTA	CACCTCATCT	AGTGGCAACA	TAGTAAGGCA	2160
GATACACTCT	CGCTGATTTT	ACTTTTGTGA	TTCTAAGGAC	TGCATAACTC	ATATGTAAAT	2220
CGCTCCTTTT	TAGGTGGCAC	AAATGIGAGG	CATTTTGGCT	CTTTCCGGGG	AGGCTAGTTA	2280
CCCTTAAGTT	ATTGGTATGA	CTGGTTTATA	GGCAAAAAAA	AGTTGCTTTT	TGGTACCTAT	2340
TAATCTATCG	TTAGAAAACC	GACTGTAAAA	AGTACAGTGC	GCATTATCTC	ATATTATAAA	2400
AGCGAGTCAT	TAGGCGTATC	TGACAAITCC	TGAATAGAGT	TCATAAACAA	TCCTGCATGA	2460
TAACCATCAC	AAACGAAATG	ATGTACCTGT	AAAGATAGCG	GTAAATATAT	TGAATTACCT	2520
TTATTAATGA	ATTTTCCCTG	TGTAAATATG	GGTAGAAGGT	AATTACTATT	ATTATTGATA	2580
TTTAAGTTAA	ACCGAGTAAA	TGAAGTCCAT	GGATAATATG	AAAGAGAAAA	AGCATTTTCA	2640
GGTATAGGTG	TTTTGGGAAA	CAATTTCCCT	GAACATTAAT	ATTTCTCTAC	ATCAGAAAGG	2700
TATAAATCAT	AAAACCTTTT	GAAGTCATTC	TTTACAGGAG	TOCAAAATCC	AGAGATGTGT	2760
TTAGATACAC	CATCAAAAAT	TGTATAAAGT	GGCTCTAACT	TATCCCAATA	AACCTAACCT	2820
CGTGGCTAT	TGTAAACAGT	TCTAAAAGCT	GTATTGAGT	TTATCACCCCT	TGTCACTAAG	2880
AAATAAATG	CAGGGTAAAA	TTTATATCTT	TCTTGTTTTA	TGTTTGGGTA	TAAAACACTA	2940
ATATCAATTT	CTGTGGTTAT	ACTAAAAGTC	GTTTGTGTGG	TCAAATAATG	ATTAAATATC	3000
TCTTTCTCTT	TOCAATGTTC	TAAATCAATT	TTATTAAGT	TCATTTGATA	TGCTCTCTAA	3060
ATTTTATCTT	AAAGTGAATT	TAGGAGGCTT	ACTGTCTGCG	TTTCTTCAAT	AGAATCAATC	3120
CTTTTATAAA	AGTCAATATT	ACTGTAAACAT	AATATATATAT	TTTAAAAATA	TOCCACTTTA	3180
TOCAATATTC	GTTCTTAAAT	TTATGAACA	ATCTTCATTC	TTTCTTCTCT	AGTCATTATT	3240

```

ATTGGTCCCA GATCTGGTTG AACCTACCTT TAATAAAATA ATTTTTCOST TCCCAATTCC 3300
ACATTGCAAT AATAGAAAAT CCATCTTCAT CGGCTTTTTC GTCATCATCT GTATGAATCA 3360
AATGGCCTTC TTCTGTGTC TCAAGGTTTA ATTTTNTATG TATTTCTTTT AACAAACCAC 3420
CATAGGAGAT TAACTTTTAA CGGTGTAAC CTTCCTCCAA ATCAGACAAA GCTTTCAAAT 3480
TCCTTCTCTC ATCATGGGTC ATAAAATCG TATCTTTTAC AGGATATTTT GCAGTTTGGT 3540
CAATTGCGA TTGTATATOC GATTATATTT TATTTTTCGG TCGAATCATT TGAACTTTAA 3600
CATTTGGATC ATAGTCTAAT TTCAATGCTT TTTTCCAAA TTGAATCATT TGTTTTIGAT 3660
TCACTAGTCT TTCTGTATTC TTAATAAAG TTGGTTCCAC ACATACCAAT ACATGCAATG 3720
GCTGATTATA AGAATTATCT TTATTATTTA TTGTCACTTC CGTTGCCAOC ATAAAACCAA 3780
CAAGATTTTT ATTAATTTTT TTATATGCA TCATTCGGOG AAATCCTTGA GGCATATCTG 3840
ACAACTCTT ATTAATTTCT TCGCATCAT AACATTTTT AACCTTATAT GTGAGAAACA 3900
ACCAACGAC TGTTCGCTTT TGTTTAATA CTTCAGCAAC AACCTTTTGT GACTGAATGC 3960
CATGTTTCAT TGCCTCTCTC CAGTTGCACA TTGCACAAAG OCTGGATTTA CAAAACCACA 4020
CTCGATACAA CTTCTCTTCT OCTGTTTCAC GATTTTGTCT ATACTCTAAT ATTTTCAGC 4080
AATCTTTTAC TCTTTCAGOC TTTTAAATTT CAAGAATATG CAGAAGTICA AAGTAATCAA 4140
CATTAGOGAT TTTCTTTTCT CTCCATGGTC TCACCTTTC ACCTTTTGTCT TTGTCCACTA 4200
AAACCTTGA TTTTTCATCT GAATAAATGC TACTATTAGG ACACATAATA TTAAAAGAAA 4260
CCCCATCTA TTTAGTTATT TGTTAGTCA CTATTAATTT TAACAGATGG GGTTTTCTCT 4320
TGCAACCAAT TTTAAGGGTT TTCAATACTT TAAAACACAT ACATACCAAC ACTTCAAGC 4380
AOCCTTCAGC AACTAAAATA AAAATGAGCT TATTTCTATA TGTATCAGA TAAGAAGAA 4440
CAAGTTCAAA ACCATCAAAA AAAGACACTT TTTTCAGTGC TTTTCTTATT TTATAAATC 4500
ATTGGGIGAT CTGACCTTCT TTTCTTTTCT AACTCTGGT TATGAGTTAG TTCAAATCTG 4560
TTCTTTTCTG GTCTAAATC GTGTTTCTCT TGAATTTGAG CTTTCTTATC CTTTACCTTG 4620
TCTACAAAC OCTTAAAAC GTTTTAAAG GCTTTTAAAG CGTCTGTAAG TTCTTAAAG 4679

```

(2) 配列番号 8 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 25 アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号 8

```

Met Asn Ile Lys Lys Leu Thr Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Phe Phe
1           5           10           15

```

```

Ile Val Leu Ala Ser Pro Val Ser Ala
          20           25

```

(2) 配列番号 9 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 435 アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号 9

Ala	Lys	Tyr	Leu	Glu	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly	Val	Ile	Met	Gln	Ala	Phe	1	5	10	15
Tyr	Trp	Asp	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ile	Trp	Trp	Asp	His	Ile	Arg	Ser	20	25	30	
Lys	Ile	Pro	Glu	Trp	Tyr	Glu	Ala	Gly	Ile	Ser	Ala	Ile	Trp	Leu	Pro	35	40	45	
Pro	Pro	Ser	Lys	Gly	Met	Ser	Gly	Gly	Tyr	Ser	Met	Gly	Tyr	Asp	Pro	50	55	60	
Tyr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Glu	65	70	75	80
Thr	Arg	Phe	Gly	Ser	Lys	Glu	Glu	Leu	Val	Arg	Leu	Ile	Gln	Thr	Ala	85	90	95	
His	Ala	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Ile	Ala	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Arg	100	105	110	
Ala	Gly	Gly	Asp	Leu	Glu	Trp	Asn	Pro	Phe	Val	Gly	Asp	Tyr	Thr	Trp	115	120	125	
Thr	Asp	Phe	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Lys	Tyr	Thr	Ala	Asn	Tyr	Leu	130	135	140	
Asp	Phe	His	Pro	Asn	Glu	Leu	His	Cys	Cys	Asp	Glu	Gly	Thr	Phe	Gly	145	150	155	160
Gly	Phe	Pro	Asp	Ile	Cys	His	His	Lys	Glu	Trp	Asp	Gln	Tyr	Trp	Leu	165	170	175	
Trp	Lys	Ser	Asn	Glu	Ser	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ser	Ile	Gly	Phe	180	185	190	

Asp Gly Trp Arg Phe Asp Tyr Val Lys Gly Tyr Gly Ala Trp Val Val
 195 200 205
 Arg Asp Trp Leu Asn Trp Trp Gly Gly Trp Ala Val Gly Glu Tyr Trp
 210 215 220
 Asp Thr Asn Val Asp Ala Leu Leu Ser Trp Ala Tyr Glu Ser Gly Ala
 225 230 235 240
 Lys Val Phe Asp Phe Pro Leu Tyr Tyr Lys Met Asp Glu Ala Phe Asp
 245 250 255
 Asn Asn Asn Ile Pro Ala Leu Val Tyr Ala Leu Gln Asn Gly Gln Thr
 260 265 270
 Val Val Ser Arg Asp Pro Phe Lys Ala Val Thr Phe Val Ala Asn His
 275 280 285
 Asp Thr Asp Ile Ile Trp Asn Lys Tyr Pro Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 290 295 300
 Thr Tyr Glu Gly Gln Pro Val Ile Phe Tyr Arg Asp Phe Glu Glu Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Lys Asp Lys Leu Ile Asn Leu Ile Trp Ile His Asp His Leu
 325 330 335
 Ala Gly Gly Ser Thr Thr Ile Val Tyr Tyr Asp Asn Asp Glu Leu Ile
 340 345 350
 Phe Val Arg Asn Gly Asp Ser Arg Arg Pro Gly Leu Ile Thr Tyr Ile
 355 360 365
 Asn Leu Ser Pro Asn Trp Val Gly Arg Trp Val Tyr Val Pro Lys Phe
 370 375 380
 Ala Gly Ala Cys Ile His Glu Tyr Thr Gly Asn Leu Gly Gly Trp Val
 385 390 395 400
 Asp Lys Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Val Tyr Leu Glu Ala Pro Pro
 405 410 415
 His Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ser Val Trp Ser Tyr Cys
 420 425 430
 Gly Val Gly
 435

(2) 配列番号10の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号10

Ala	Lys	Tyr	Leu	Glu	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly
1				5					10

(2) 配列番号11の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号11

Val	Ile	Met	Gln	Ala	Phe	Tyr	Trp	Asp	Val
1				5					10

(2) 配列番号12の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号12

Pro	Gly	Gly	Gly	Ile	Trp	Trp	Asp	His	Ile
1				5					10

(2) 配列番号13の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号 13

Arg	Ser	Lys	Ile	Pro	Glu	Trp	Tyr	Glu	Ala
1				5					10

(2) 配列番号 14 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10 アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号 14

Gly	Ile	Ser	Ala	Ile	Trp	Leu	Pro	Pro	Pro
1				5					10

(2) 配列番号 15 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10 アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号 15

Ser	Lys	Gly	Met	Ser	Gly	Gly	Tyr	Ser	Met
1				5					10

(2) 配列番号 16 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10 アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号 16

Gly Tyr Asp Pro Tyr Asp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

(2) 配列番号17の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号17

Gly Glu Tyr Tyr Gln Lys Gly Thr Val Glu
 1 5 10

(2) 配列番号18の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号18

Thr Arg Phe Gly Ser Lys Glu Glu Leu Val
 1 5 10

(2) 配列番号19の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号19

Arg Leu Ile Gln Thr Ala His Ala Tyr Gly
 1 5 10

(2) 配列番号20の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号20

Ile	Lys	Val	Ile	Ala	Asp	Val	Val	Ile	Asn
1				5					10

(2) 配列番号21の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号21

His	Arg	Ala	Gly	Gly	Asp	Leu	Glu	Trp	Asn
1				5					10

(2) 配列番号22の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号22

Pro	Phe	Val	Gly	Asp	Tyr	Thr	Trp	Thr	Asp
1				5					10

(2) 配列番号23の情報

(i) 配列の特徴

- Phe Ser Lys Val Ala Ser Gly Lys Tyr Thr
1 5 10

Ala Asn Tyr Leu Asp Phe His Pro Asn Glu
1 5 10

Leu His Cys Cys Asp Glu Gly Thr Phe Gly
1 5 10

(A) 長さ 10 アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号26

Gly	Phe	Pro	Asp	Ile	Cys	His	His	Lys	Glu
1				5					10

(2) 配列番号27の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号27

Trp	Asp	Gln	Tyr	Trp	Leu	Trp	Lys	Ser	Asn
1				5					10

(2) 配列番号28の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号28

Glu	Ser	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ser	Ile
1				5					10

(2) 配列番号29の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号29

Gly	Phe	Asp	Gly	Trp	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val
1				5					10

(2) 配列番号30の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号30

Lys	Gly	Tyr	Gly	Ala	Trp	Val	Val	Arg	Asp
1				5					10

(2) 配列番号31の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号31

Trp	Leu	Asn	Trp	Trp	Gly	Gly	Trp	Ala	Val
1				5					10

(2) 配列番号32の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号32

Gly Glu Tyr Trp Asp Thr Asn Val Asp Ala
 1 5 10

(2) 配列番号33の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号33

Ileu Leu Ser Trp Ala Tyr Glu Ser Gly Ala
 1 5 10

(2) 配列番号34の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号34

Lys Val Phe Asp Phe Pro Leu Tyr Tyr Lys
 1 5 10

(2) 配列番号35の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号35

Met Asp Glu Ala Phe Asp Asn Asn Asn Ile
 1 5 10

(2) 配列番号36の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号36

Pro	Ala	Leu	Val	Tyr	Ala	Leu	Gln	Asn	Gly
1				5					10

(2) 配列番号37の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号37

Gln	Thr	Val	Val	Ser	Arg	Asp	Pro	Phe	Lys
1				5					10

(2) 配列番号38の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号38

Ala	Val	Thr	Phe	Val	Ala	Asn	His	Asp	Thr
1				5					10

(2) 配列番号39の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ 10アミノ酸
- (B) タイプ アミノ酸
- (D) トポロジー 線状
- (ii) 分子タイプ タンパク質
- (xi) 配列番号39

Asp Ile Ile Trp Asn Lys Tyr Pro Ala Tyr
1 5 10

(2) 配列番号40の情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ 10アミノ酸
 - (B) タイプ アミノ酸
 - (D) トポロジー 線状
- (ii) 分子タイプ タンパク質
- (xi) 配列番号40

Ala Phe Ile Leu Thr Tyr Glu Gly Gln Pro
1 5 10

(2) 配列番号41の情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ 10アミノ酸
 - (B) タイプ アミノ酸
 - (D) トポロジー 線状
- (ii) 分子タイプ タンパク質
- (xi) 配列番号41

Val Ile Phe Tyr Arg Asp Phe Glu Glu Trp
1 5 10

(2) 配列番号42の情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ 10アミノ酸
 - (B) タイプ アミノ酸

- (D) トポロジー 線状
- (ii) 分子タイプ タンパク質
- (xi) 配列番号42

Leu Asn Lys Asp Lys Leu Ile Asn Leu Ile
1 5 10

(2) 配列番号43の情報

- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ 10アミノ酸
- (B) タイプ アミノ酸
- (D) トポロジー 線状
- (ii) 分子タイプ タンパク質
- (xi) 配列番号43

Trp Ile His Asp His Leu Ala Gly Gly Ser
1 5 10

(2) 配列番号44の情報

- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ 10アミノ酸
- (B) タイプ アミノ酸
- (D) トポロジー 線状
- (ii) 分子タイプ タンパク質
- (xi) 配列番号44

Thr Thr Ile Val Tyr Tyr Asp Asn Asp Glu
1 5 10

(2) 配列番号45の情報

- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ 10アミノ酸
- (B) タイプ アミノ酸
- (D) トポロジー 線状
- (ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号45

Leu	Ile	Phe	Val	Arg	Asn	Gly	Asp	Ser	Arg
1				5					10

(2) 配列番号46の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号46

Arg	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr	Tyr	Ile	Asn	Leu
1				5					10

(2) 配列番号47の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号47

Ser	Pro	Asn	Trp	Val	Gly	Arg	Trp	Val	Tyr
1				5					10

(2) 配列番号48の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号48

Val Pro Lys Phe Ala Gly Ala Cys Ile His
1 5 10

(2) 配列番号49の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号49

Glu Tyr Thr Gly Asn Leu Gly Gly Trp Val
1 5 10

(2) 配列番号50の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号50

Asp Lys Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Val
1 5 10

(2) 配列番号51の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 10アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号51

Tyr Leu Glu Ala Pro Pro His Asp Pro Ala
1 5 10

(2) 配列番号52の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ 15アミノ酸

(B) タイプ アミノ酸

(D) トポロジー 線状

(ii) 分子タイプ タンパク質

(xi) 配列番号52

Asn	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Val	Trp	Ser	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly
1				5				10					15	

【 図 1 】

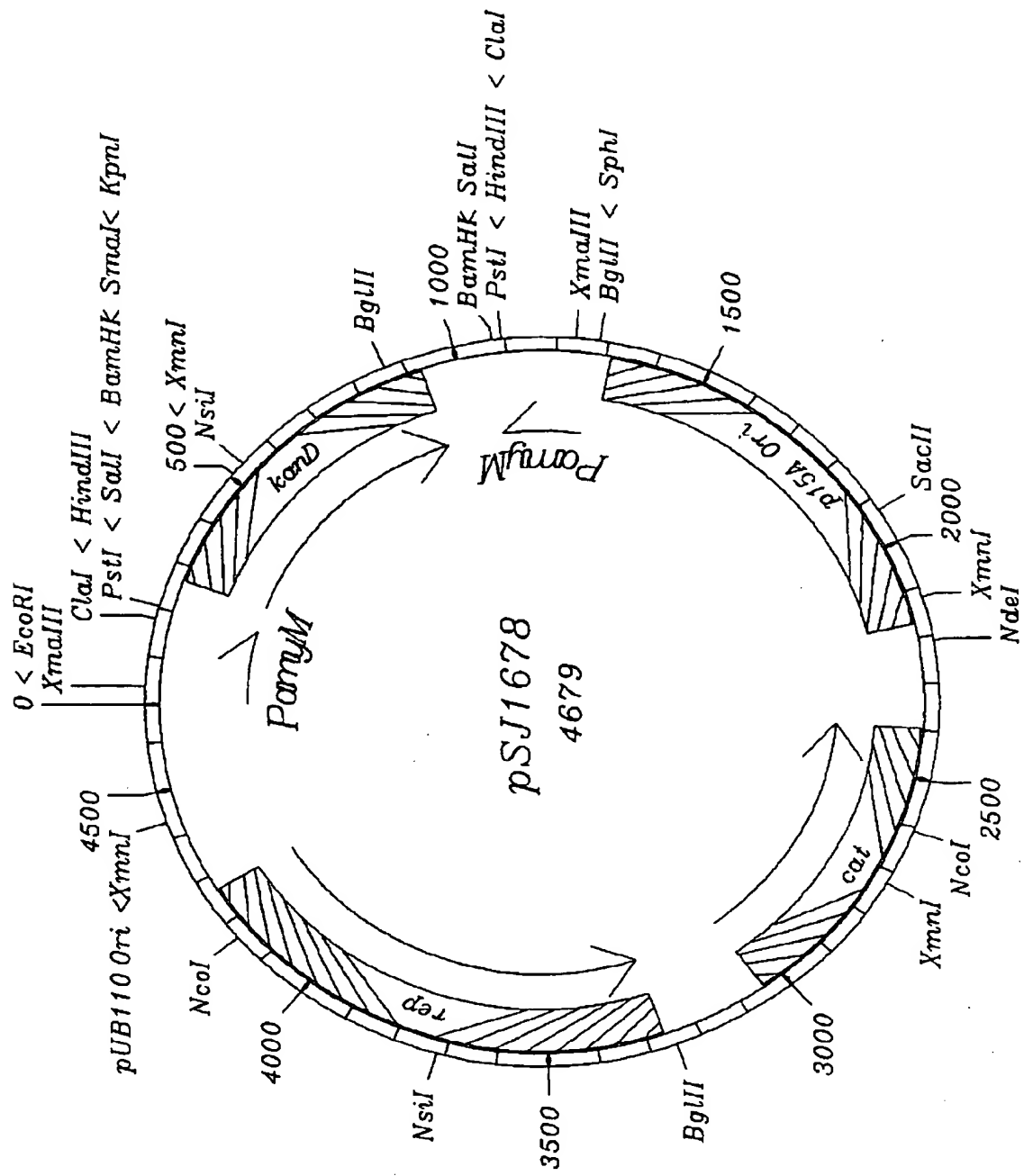


Fig. 1

【 図 2 】

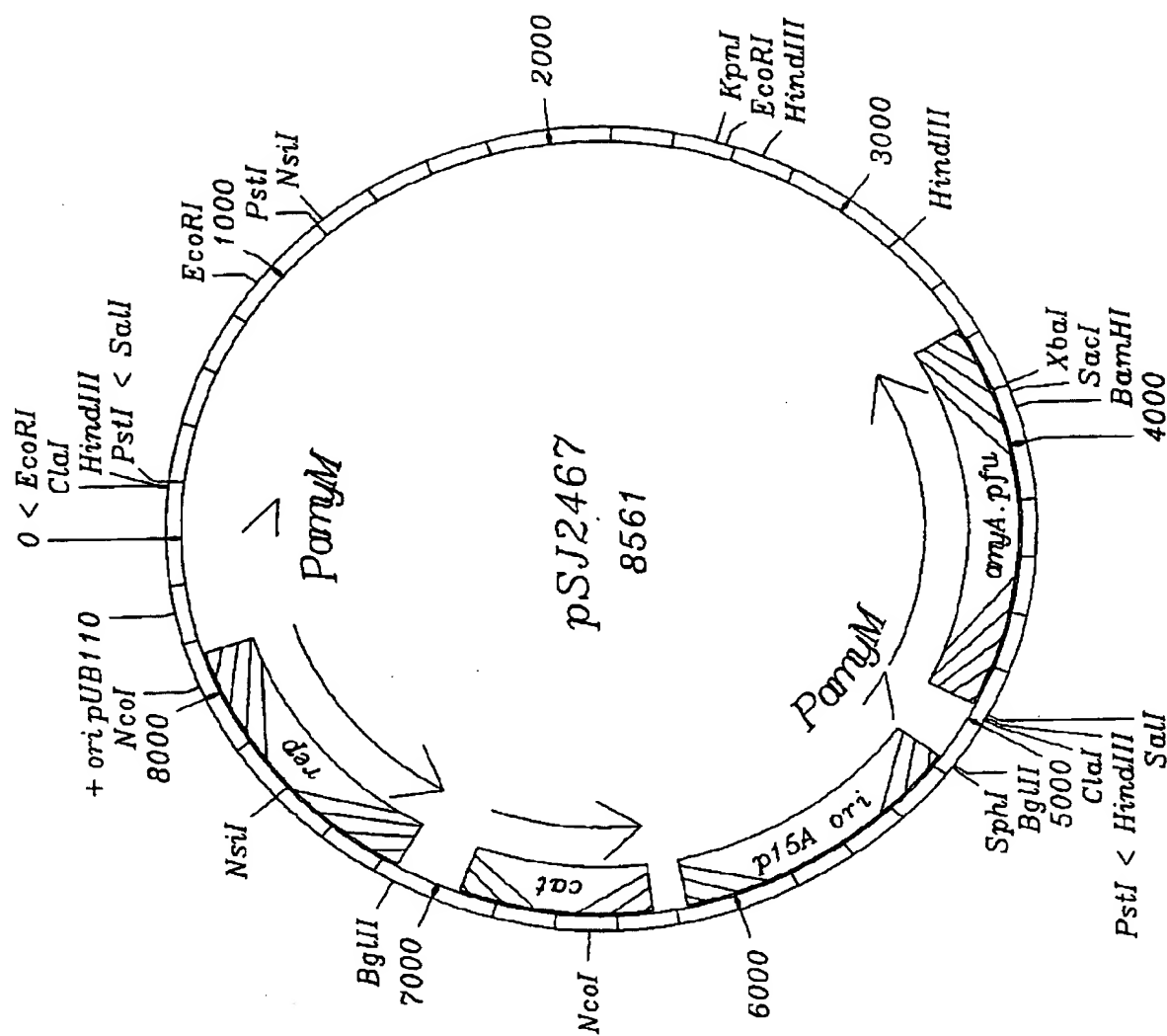


Fig. 2

【 図 3 】

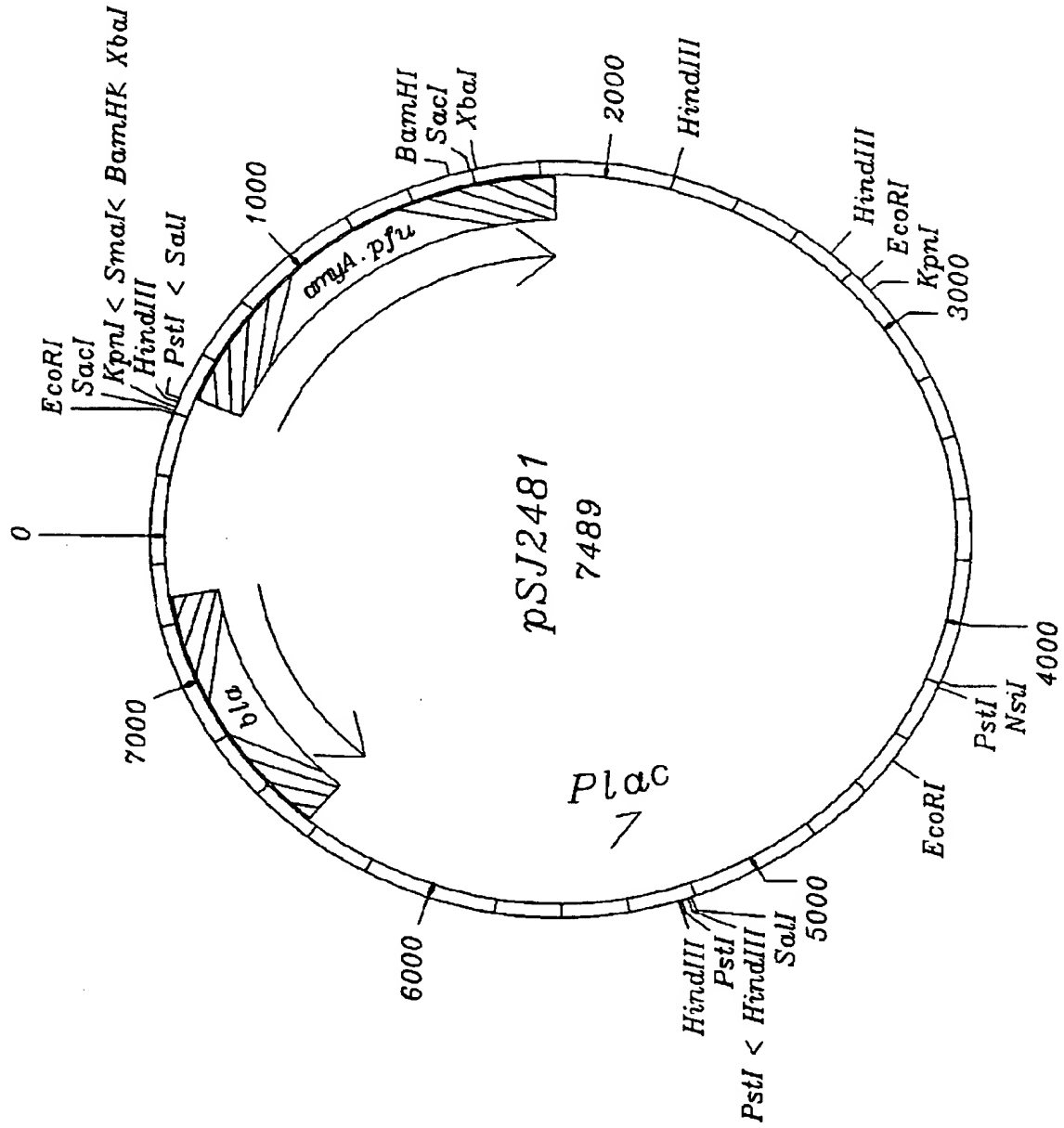


Fig. 3

【 図 4 】

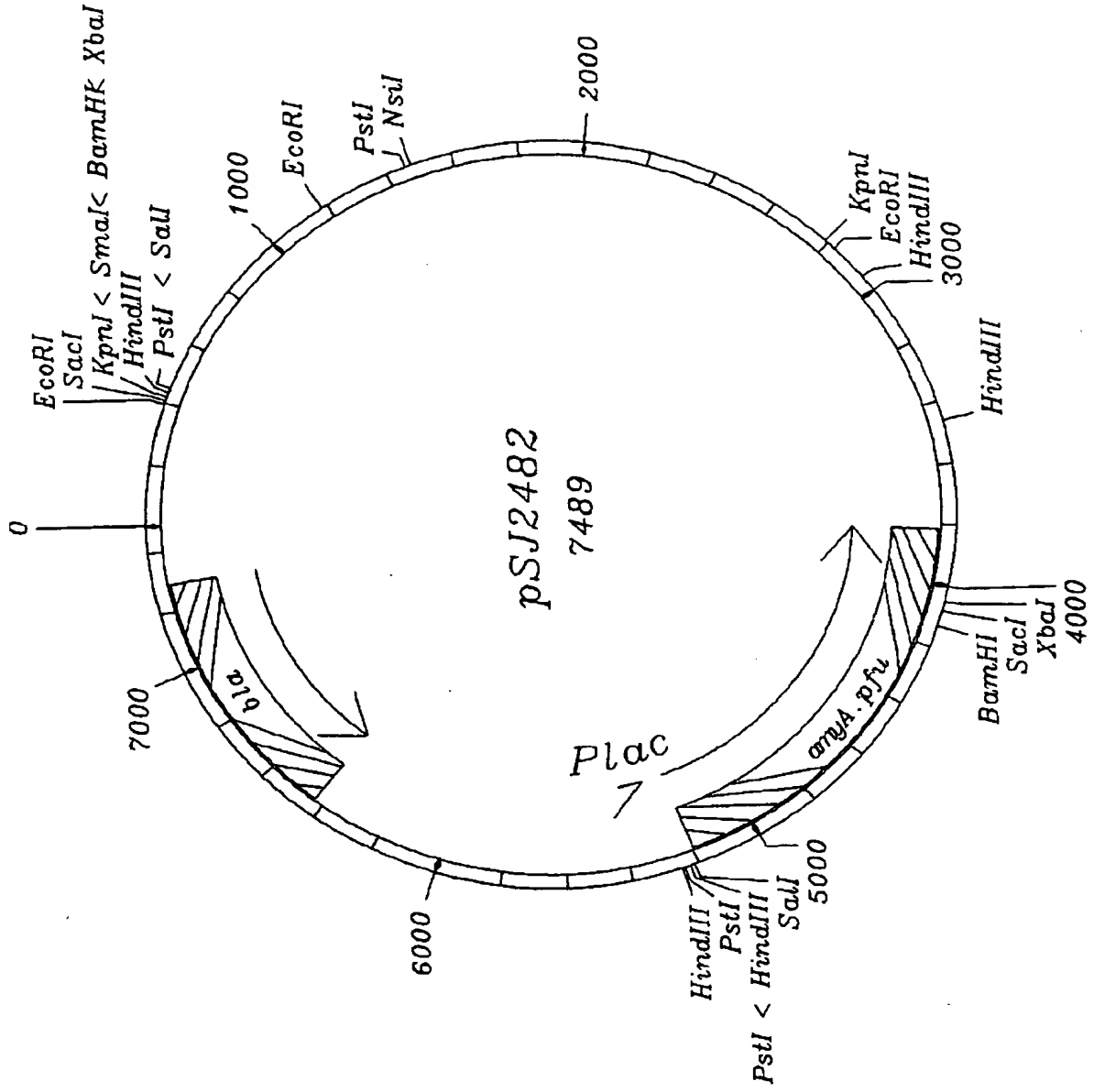


Fig. 4

【 图 5 】

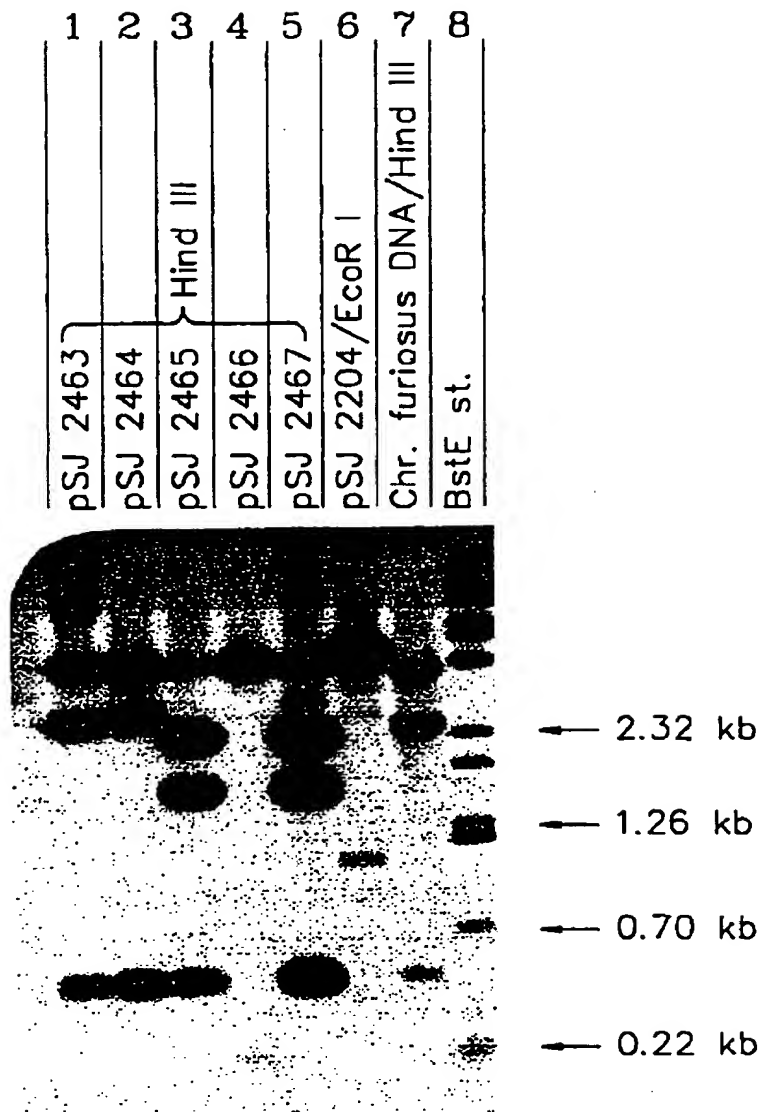


Fig. 5

【 图 6 】

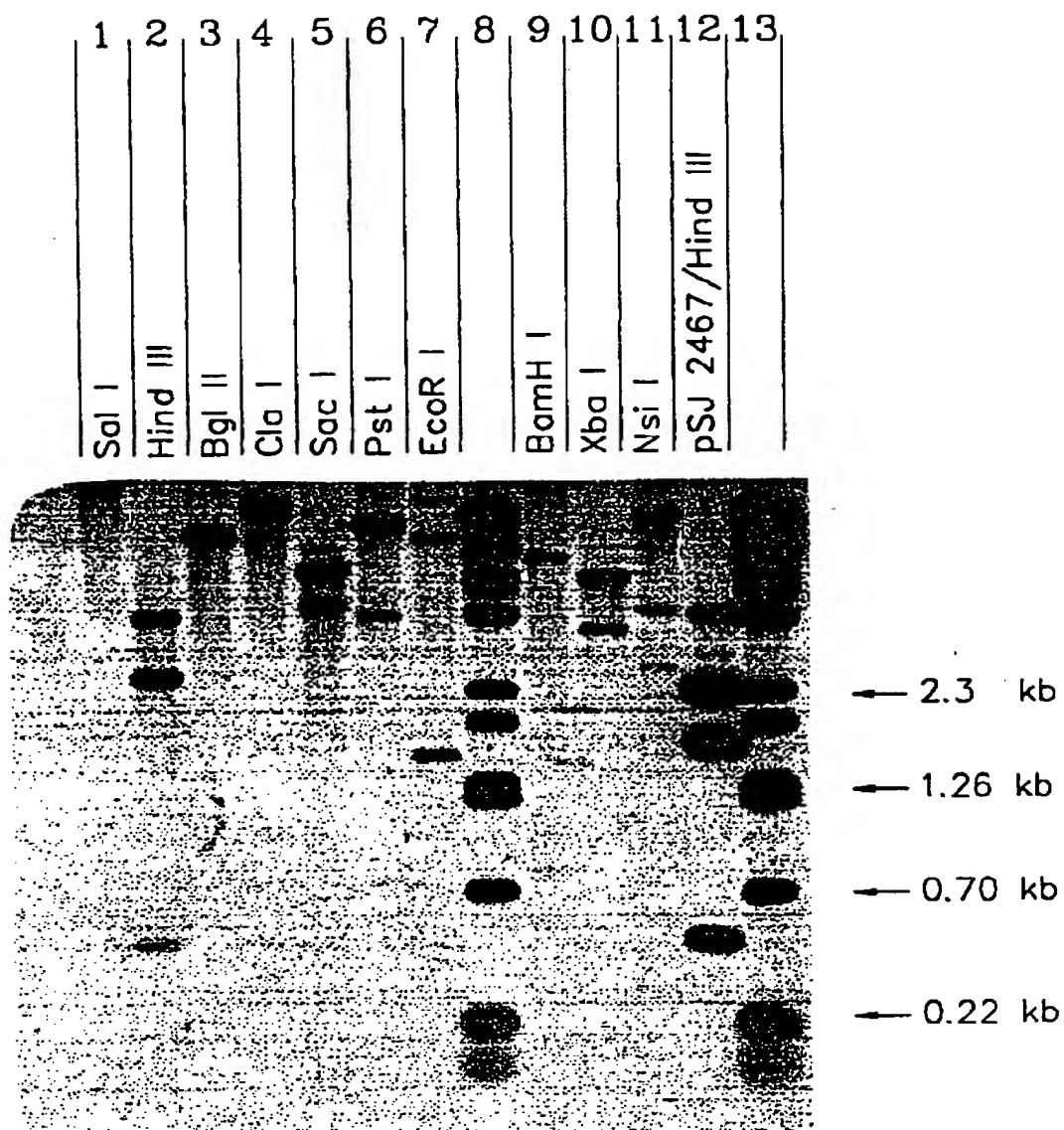


Fig. 6

【 図 7 】

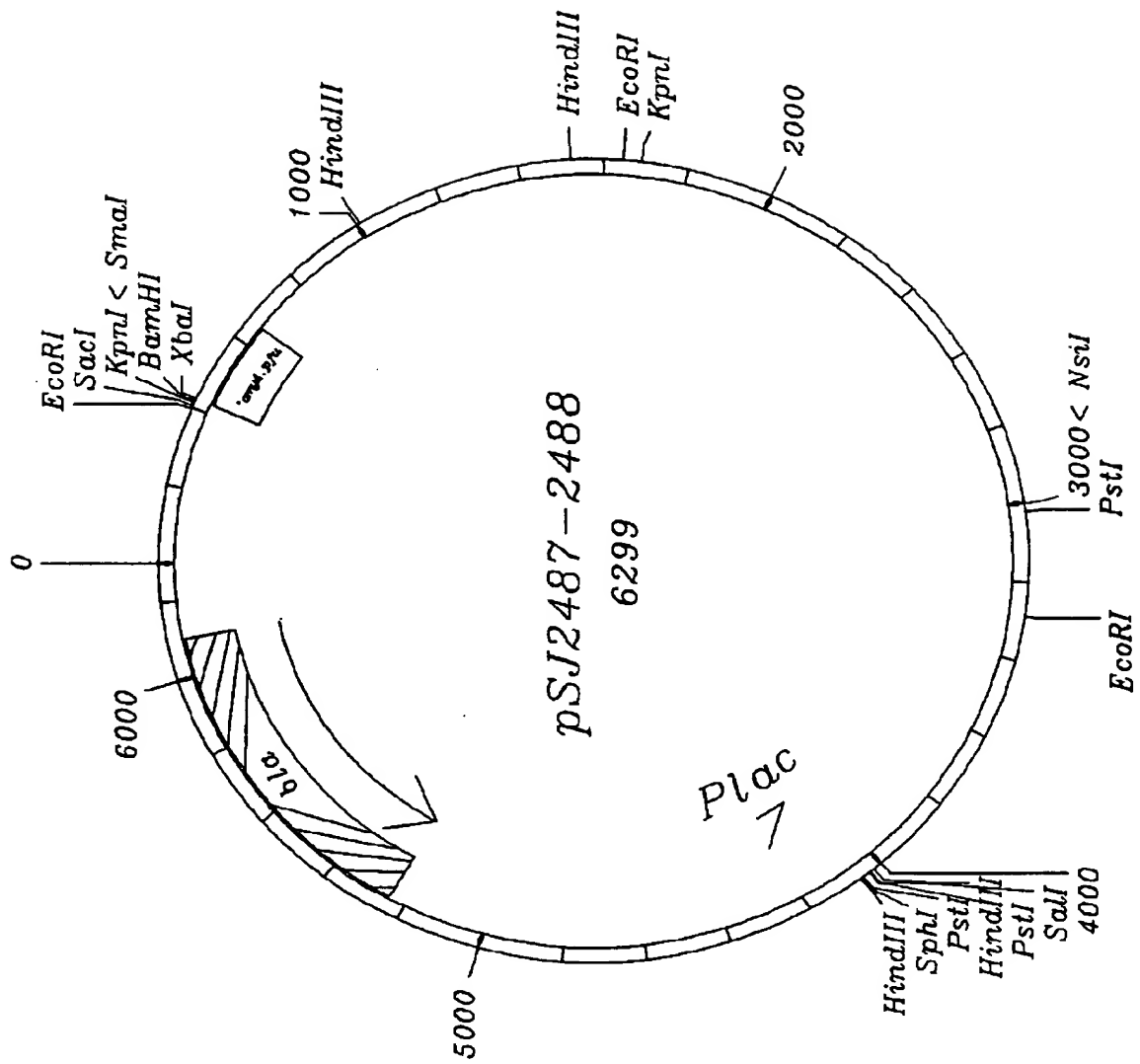


Fig. 7

【 图 8 】

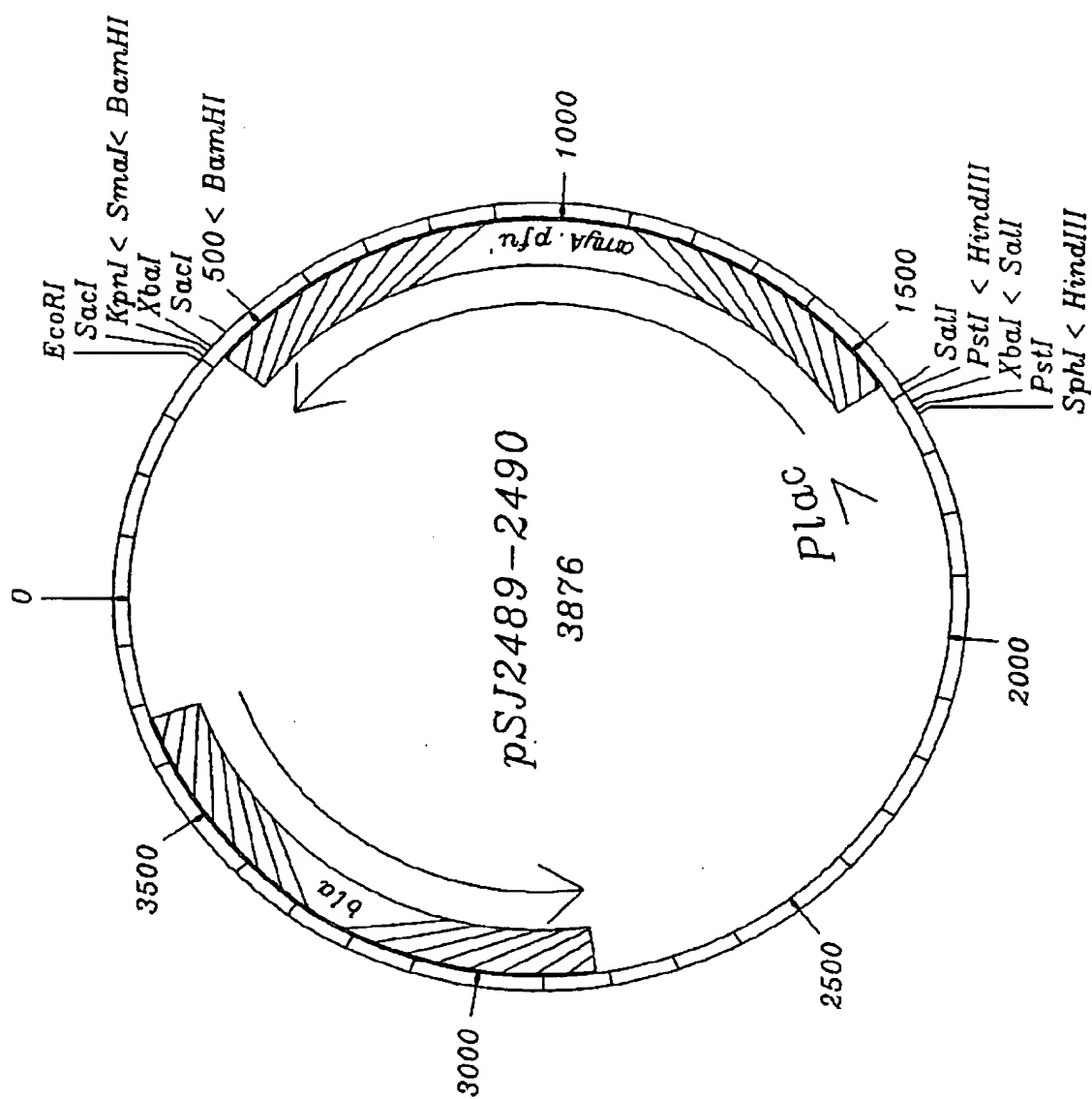


Fig. 8

【 図 9 】

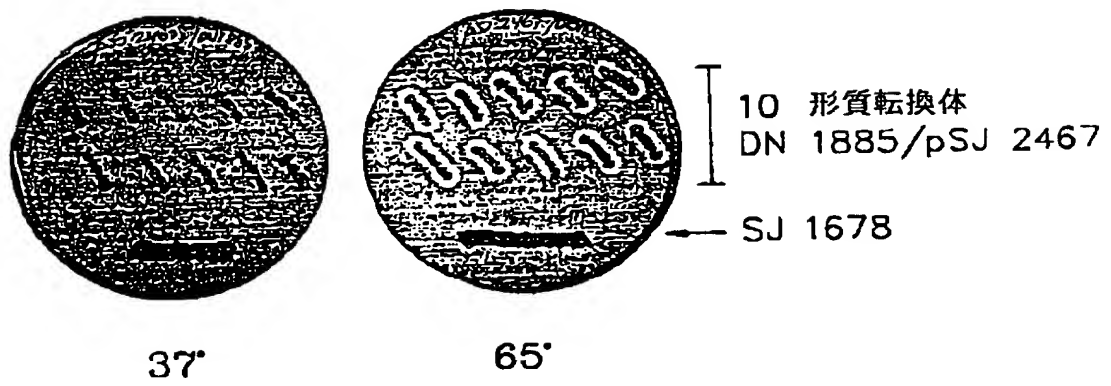


Fig. 9

[1 0]

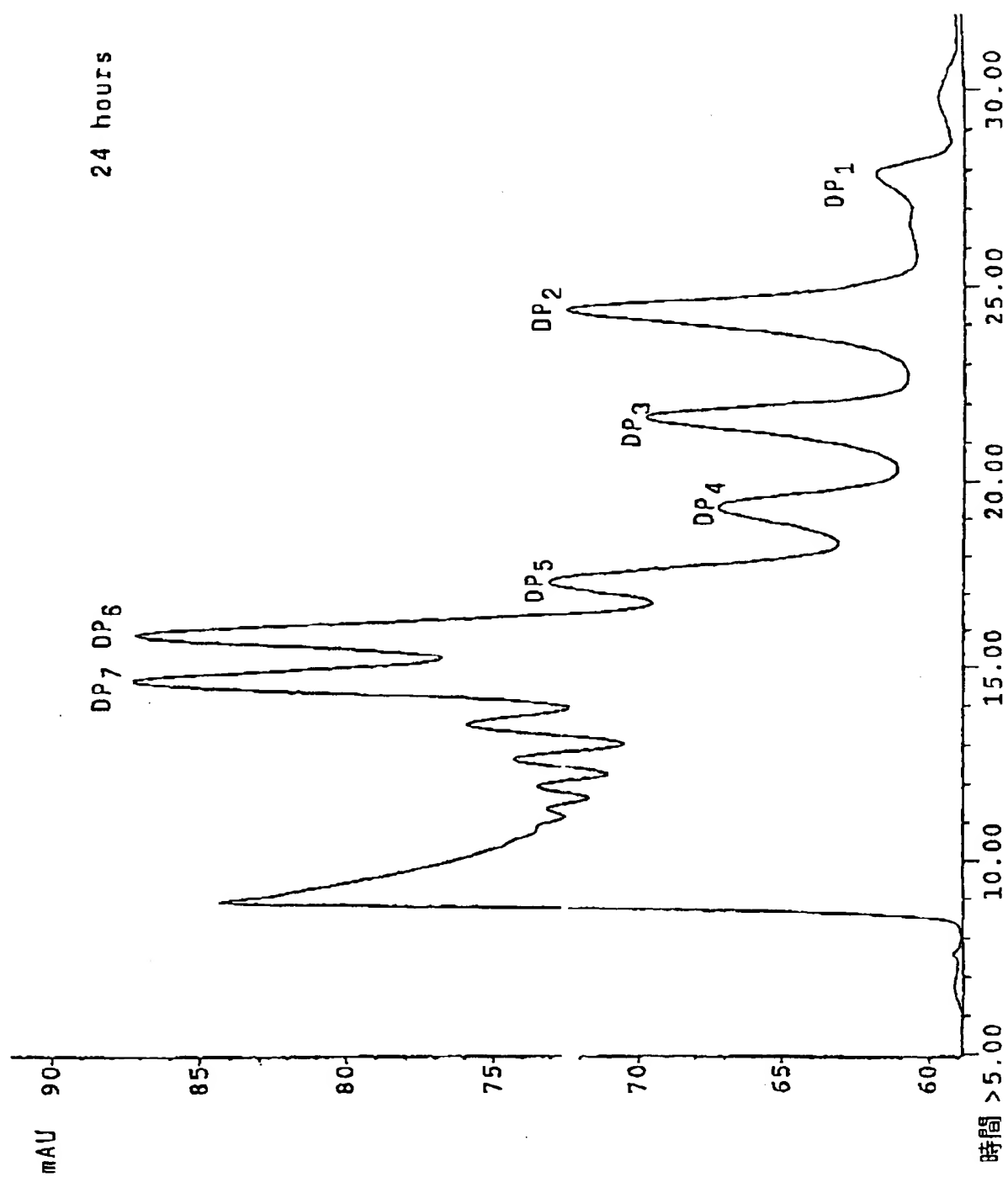


Fig. 10

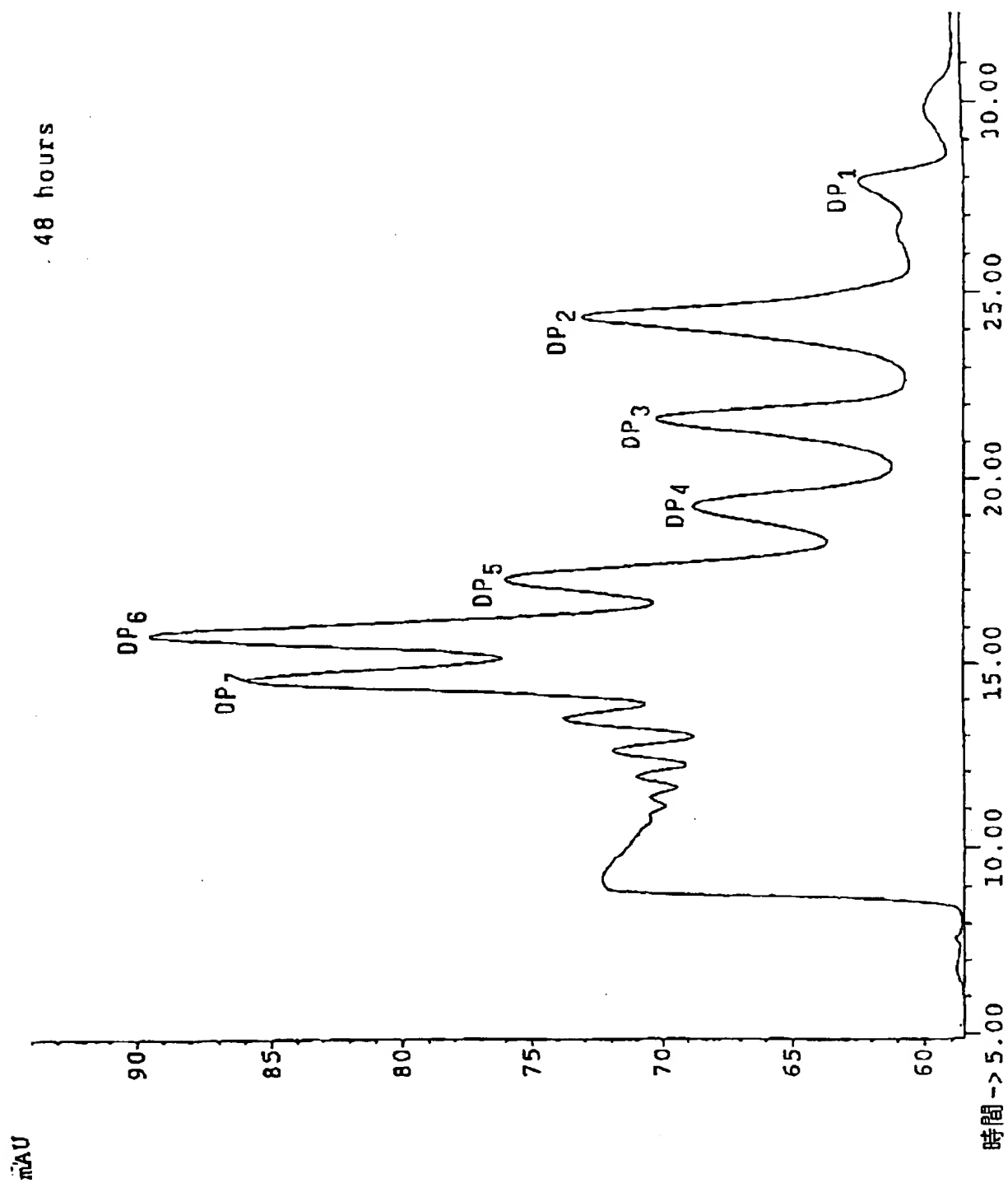


Fig. 11

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年10月10日

【補正内容】

請求の範囲

1. ピロコッカス α -アミラーゼを又は α -アミラーゼ活性をもち、そして／又はピロコッカス α -アミラーゼと免疫学的に交差反応性であるその変異体をエンコードしているDNA配列を含んで成るDNA構築物であって、そのDNA配列が、配列番号1中に示すDNA配列又は配列番号1中に示すDNA配列に基づいて調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる上記配列のアナログを含んで成るようなDNA構築物。

2. ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列が、

i) 配列番号2, 3, 4, 5及び／又は6中に示す部分的DNA配列又は配列番号2, 3, 4, 5及び／又は6中に示すDNA配列に基づいて調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる上記部分的配列のアナログを含んで成り、又は

ii) 配列番号2, 3, 4, 5及び／又は6中に示すDNA配列に基づき調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズする5kbのゲノムDNA配列内に位置するゲノム・ピロコッカスDNA配列に一致し、例えば、配列番号5及び6中に示すDNA配列に基づいてそれぞれ調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズすることができる添付の配列番号5及び6又はそれらのアナログ中に同定された部分的DNA配列の間に位置し、そして場合によりそれを含んで成るゲノム・ピロコッカスDNA断片に一致するような、請求項1に記載のDNA構築物。

3. 請求項1又は2中に定義したような特性の中のいずれかをもつDNA配列とハイブリダイズするピロコッカスDNA配列を含んで成るDNA構築物。

4. デンブun分解活性を示す酵素をエンコードしているDNA構築物であって、そのDNA構築物が、

a) 以下の部分的アミノ酸配列：

- (a) AKYLELEEGG (配列番号10) ; (b) VIMQAFYWDV (配列番号11) ;
(c) PGGGIWWDHI (配列番号12) ; (d) RSKIPEWYEA (配列番号13) ;
(e) GISAIWLPPP (配列番号14) ; (f) SKGMSGGYSM (配列番号15) ;
(g) GYDPYDYFDL (配列番号16) ; (h) GEYYQKGTVE (配列番号17) ;
(i) TRFGSKEELV (配列番号18) ; (j) RLIQTAHAYG (配列番号19) ;
(k) IKVIADVVIN (配列番号20) ; (l) HRAGGDLEWN (配列番号21) ;
(m) PFVGDYTWTD (配列番号22) ; (n) FSKVASGKYT (配列番号23) ;
(o) ANYLDFHPNE (配列番号24) ; (p) LHCCDEGTFG (配列番号25) ;
(q) GFPDICHHKE (配列番号26) ; (r) WDQYWLWKS (配列番号27) ;
(s) ESYAAYLRIS (配列番号28) ; (t) GFDGWRFDYV (配列番号29) ;
(u) KGYGAWVVRD (配列番号30) ; (v) WLNWWGGWAV (配列番号31) ;
(x) GEYWDTNVDA (配列番号32) ; (y) LLSWAYESGA (配列番号33) ;
(z) KVFDFFLYYK (配列番号34) ; (A) MDEAFDNNNI (配列番号35) ;
(B) PALVYALQNG (配列番号36) ; (C) QTVVSRDPFK (配列番号37) ;
(D) AVTFVANHDT (配列番号38) ; (E) DIIWNKYPAY (配列番号39) ;
(F) AFILTYEGQP (配列番号40) ; (G) VIFYRDFEEW (配列番号41) ;
(H) LNKDKLINLI (配列番号42) ; (I) WIHDHLAGGS (配列番号43) ;
(J) TTIVYYDNDE (配列番号44) ; (K) LIFVRNGDSR (配列番号45) ;
(L) RPGLITYINL (配列番号46) ; (M) SPNWWGRWVY (配列番号47) ;
(N) VPKFAGACIH (配列番号48) ; (O) EYTGNLGGWV (配列番号49) ;
(P) DKRVDSSGWV (配列番号50) ; (Q) YLEAPPHDPA (配列番号51) ;
(R) NGYYGYSVWSYCGVG (配列番号52) 、

をエンコードしているDNA配列を含んで成り、そして／又は

b) 配列番号1-6中に示すDNA配列の中のいずれかに基づいて

、そのDNA配列の中のいずれかによりエンコードされているアミノ酸配列又は配列番号9中に示すアミノ酸配列に基づいて、又は上記a)中に列記した部分的アミノ酸配列(a)-(R)の中のいずれかに基づいて、調製されたオリゴヌクレ

オチド・プローブとハイブリダイズするDNA配列を含んで成り、そして／又は

c) 配列番号9中に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつポリペプチドをエンコードしている、

ようなDNA構築物。

5. デンブン分解活性を示す酵素が、 α -アミラーゼ、特に、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体である、請求項4に記載のDNA構築物。

6. DNA配列が、好熱性始原細菌から得られることができる、請求項1-5の中のいずれかに記載のDNA構築物。

7. DNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ (Pyrococcus woesei) の株又はピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) の株から得られることができる、請求項6に記載のDNA構築物。

8. DNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ株DSM 3773又はピロコッカス・フリオサス株DSM 3638から、あるいは α -アミラーゼ生産能力をもつこれらの株のいずれかの突然変異体又は誘導体から、得られることができる、請求項7に記載のDNA構築物。

9. 請求項1-8の中のいずれかに記載のDNA構築物を宿すベクター。

10. プラスミド又はバクテリオファージである、請求項9に記載のベクター。

11. デンブン分解酵素、例えばピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の発現を許容するDNA配列をさらに含んで成る発現ベクターである、請求項9又は10に記載のベクター。

12. 請求項1-8の中のいずれかに記載のDNA構築物又は請求項9-10の中のいずれかに記載のベクターを宿す宿主細胞。

13. 微生物である、請求項12に記載の宿主細胞。

14. バクテリア又は菌である、請求項13に記載の宿主細胞。

15. グラム陽性菌、例えば、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・レントス (Bacillus lentus)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・ス

テアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス・アルカロフィルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefacience)、バチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・ラウタス (Bacillus lautus)、バチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) 又はストレプトミセス・リビダンス (Streptomyces lividans) 又はストレプトミセス・ムリナス (Streptomyces murinus)、あるいはグラム陰性菌、例えば、E. コリ (E. coli) である、請求項14に記載の宿主細胞。

16. バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis) の細胞とは異なり、そしてピロコッカス (Pyrococcus) α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列を含んで成るDNA構築物を宿す、バチルス細胞。

17. ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体をエンコードしているDNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ (Pyrococcus woesei) の株又はピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) の株から得られることができる、請求項16に記載のバチルス (Bacillus) 細胞。

18. DNA配列が、ピロコッカス・ウォエセイ株DSM 3773又はピロコッカス・フリオサス株DSM 3638又は α -アミラーゼ活性を作り出すことができるこれらの株のいずれかの突然変異体又は誘導体から、得られることができる、請求項17に記載のバチルス細胞。

19. バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・レントス (Bacillus lentus)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス・アルカロフィルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefacience)、バチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・ラウタス (Bacillus lautus) 又はバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) から得られる、請求項16に記載のバチルス細胞。

20. デンプン分解酵素、特にピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の製

造方法であって、そのデンプン分解酵素の発現を許容する条件下、好適な培養基中、請求項12-19の中のいずれかに記載の細胞を培養し、そしてそのカルチャーから得られたデンプン分解酵素を回収することを含んで成る方法。

21. 請求項20に記載の方法により製造された、デンプン分解酵素、特に、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体。

22. 配列番号9中に示すアミノ酸配列を含んで成るピロコッカス α -アミラーゼ、あるいは α -アミラーゼ活性をもち、そして／又は配列番号9中に示すアミノ酸配列を含んで成る α -アミラーゼと免疫学的に交差反応性であり、そして／又は配列番号9中に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつその変異体。

23. a) 以下の部分的配列：

- (a) AKYLELEEGG (配列番号10) ; (b) VIMQAFYWDV (配列番号11) ;
(c) PGGGIWWDHI (配列番号12) ; (d) RSKIPEWYEA (配列番号13) ;
(e) GISAIWLPPP (配列番号14) ; (f) SKGMSGGYSM (配列番号15) ;
(g) GYDPYDYFDL (配列番号16) ; (h) GEYYQKGTVE (配列番号17) ;
(i) TRFGSKEELV (配列番号18) ; (j) RLIQTAHAYG (配列番号19) ;
(k) IKVIADVVIN (配列番号20) ; (l) HRAGGDLEWN (配列番号21) ;
(m) PFVGDTWTD (配列番号22) ; (n) FSKVASGKYT (配列番号23) ;
(o) ANYLDFHPNE (配列番号24) ; (p) LHCCDEGTFG (配列番号25) ;
(q) GFPDICHHKE (配列番号26) ; (r) WDQYWLWKS (配列番号27) ;
(s) ESYAAYLRSI (配列番号28) ; (t) GFDGWRFDYV (配列番号29) ;
(u) KGYGAWVVRD (配列番号30) ; (v) WLNWWGGWAV (配列番号31) ;
(x) GEYWDTNVDA (配列番号32) ; (y) LLSWAYESGA (配列番号33) ;
(z) KVDFDFLYYK (配列番号34) ; (A) MDEAFDNNNI (配列番号35) ;
(B) PALVYALQNG (配列番号36) ; (C) QTVVSRDPFK (配列番号37) ;
(D) AVTFVANHDT (配列番号38) ; (E) DIIWNKYPAY (配列番号39) ;
(F) AFILTYEGQP (配列番号40) ; (G) VIFYRDFEEW (配列番号41) ;
(H) LNKDKLINLI (配列番号42) ; (I) WIHDHLAGGS (配列番号43) ;

(J) TTIVYYDNDE (配列番号44) ; (K) LIFVRNGDSR (配列番号45) ;
(L) RPGLITYINL (配列番号46) ; (M) SPNWVGRWVY (配列番号47) ;
(N) VPKFAGACIH (配列番号48) ; (O) EYTGNLGGWV (配列番号49) ;
(P) DKRVDSSGWV (配列番号50) ; (Q) YLEAPPHDPA (配列番号51) ;
(R) NGYYGYSVWSYCGVG (配列番号52) ,

を含んで成り、そして／又は

b) 配列番号1-6中に示すDNA配列の中のいずれかに基づいて、そのDNA配列の中のいずれかによりエンコードされているアミノ酸配列又は配列番号9中に示すアミノ酸配列に基づいて、又は上記

a) 中に列記した部分的アミノ酸配列(a)-(R)の中のいずれかに基づいて、調製されたオリゴヌクレオチド・プローブとハイブリダイズするDNA配列によりエンコードされており、そして／又は

c) 配列番号9中に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつ、デンプン分解酵素。

24. 酵素が、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体である、請求項23に記載のデンプン分解酵素。

25. 請求項21-24の中のいずれかに記載のピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の存在中、水性デンプン・スラリーを酵素的液化に供することを含んで成るデンプン液化方法。

26. 方法が、デンプン・スラリーへのカルシウム塩の添加を本質的に伴わずに行われる、請求項25に記載のデンプン液化方法。

27. 方法が、120分までにわたる100~140℃のレンジ内の温度におけるジェットクッキング、場合によりその後の、約30~120分にわたる90~100℃のレンジ内において保持されるであろう上記温度の減少により行われ、その後、このようにして液化されたデンプンが老化(retrogradation)に対して安定であり、そのpHが、その方法の全体を通じて約4.0~5.5において保持されるような、請求項25又は26に記載のデンプン液化方法。

28. 液化された酵素が、中間のpH調整を実質的に伴わずに、グルコアミラーゼ

の存在中、酵素的糖化に供される、請求項25-27の中のいずれかに記載のデンプン液化方法。

29. 糖化と同時の又はその後の酵母によるエタノール発酵をさらに含んで成る、請求項28に記載のデンプン液化方法。

30. デンプン液化方法であって、

a) ピロコッカス α -アミラーゼ又はその変異体の発現を許容す

る条件下、好適な培養基中、ピロコッカス α -アミラーゼ又は α -アミラーゼ活性をもつその変異体をエンコードしているDNA配列を担持している請求項12-19の中のいずれかに記載の好適な宿主細胞を培養し、そしてそのカルチャーから得られた α -アミラーゼ又はその変異体を回収し、そして

b) 段階a)において回収された α -アミラーゼ又はその変異体の存在中、水性デンプン・スラリーを酵素的液化（融解）に供する、
を含んで成る方法。

31. デンプンの液化及び／又は糖化、デンプンの枝切断、シロップの生産、シクロデキストリンの生産、又はオリゴ糖の生産のための、請求項21-24の中のいずれかにおいて定められたデンプン分解酵素の使用。

【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. ☒

PCT/DK 94/00071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC5: C12N 9/28, C12N 15/75 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC5: C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EMBL, PIRONLY, GENESEQ, SWISSPROT, MEDLINE, BIOSIS, WPI, CLAIMS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A1, 9011352 (NOVO-NORDISK A/S), 4 October 1990 (04.10.90)	1-21,23-31
X	Dialog Information Services, File 5, BIOSIS, Dialog accession no. 8615400, Biosis accession no. 92080400, KOCH R et al: "Purification and properties of a hyperthermoactive alpha amylase from the archaeobacterium pyrococcus-woesei", Arch Microbiol 155 (6), 1991, 572-578	1-21,23-31
P,X	WO, A1, 9310248 (NOVO-NORDISK A/S), 27 May 1993 (27.05.93)	1-21,23-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 August 1994		09 -08- 1994
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Jonny Brun Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 94/00071

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the attached sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-21 and 23-31

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 94/00071

As is stated in Annex B to Administrative Instructions under the PCT, in force July 1, 1992 (PCT) GAZETTE 1992, June 25, pages 7062-9, see page 7063 and example 5) unity of invention exists only when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding "special technical features" - i.e. features that define a contribution which each of the inventions makes over the prior art.

Since there seem to be no unifying special technical feature for the partial DNA sequences identified as SEQ ID No: 1-6 of claim 1 and the partial amino acid sequences identified as SEQ ID No: 9-52 of claim 4 the present claims are considered to comprise 50 separate inventions:

Inventions 1-6, claims 1 (SEQ ID No: 1-6 respectively) 2,3 (completely) and claims 4-21, 23-31 (partially) relate to a DNA construct comprising a DNA sequence encoding a pyrococcus alpha-amylase or a variant thereof having alpha-amylase activity and/or being immunologically crossreactive with a pyrococcus alpha-amylase, said DNA sequence comprising the partial sequences SEQ ID No: 2,3,4,5 and/or 6, or the DNA sequence SEQ ID No: 1.

Inventions 7-50, claim 22 (completely) and claims 4 (SEQ ID No: 9-52 respectively)-21,23-31 (partially) relate to a DNA construct encoding an enzyme exhibiting amylolytic activity and:

- . comprising a DNA sequence encoding at least one of the partial amino acid sequences SEQ ID No: 10-52, and/or
- . comprises a DNA sequence hybridizing with an oligonucleotide probe on the basis of any of SEQ ID No: 1-6, 9,10-52 and/or
- . encodes a polypeptide being at least 70% homologous with the amino acid sequence SEQ ID No: 9. and to an amolytic enzyme which
- . comprises at least one of the partial sequences SEQ ID No: 10-52 and/or
- . is encoded by a DNA sequence hybridizing with an oligonucleotide probe prepared on the basis of any of SEQ ID No: 1,6,9,10-52 and/or
- . is at least 70% homologous with the amino acid sequence SEQ ID No: 9.

The search has been restricted to the invention first mentioned in the claims, i.e. claim 1 SEQ ID No: 2 and to the invention relating to SEQ ID No: 1 as an additional fee were paid.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

02/07/94

International application No.

PCT/DK 94/00071

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 9011352	04/10/90	CA-A- 2050485 DE-A- 3909096 EP-A- 0464095	21/09/90 27/09/90 08/01/92
WO-A1- 9310248	27/05/93	FI-A,D- 942227	13/05/94

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 7/06		9548-4B	
19/14		Z 7432-4B	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:01)			
(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:07)			
(C 1 2 N 9/30			
C 1 2 R 1:07)			
			C 1 2 R 1:01)
(31) 優先権主張番号	1 2 4 5 / 9 3		
(32) 優先日	1993年11月3日		
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE,		
	DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M		
	C, NL, PT, SE), AU, BR, CA, CN, F		
	I, JP, KR, RU		